



**ÉTUDE DES RIBORÉGULATEURS GUANINE ET DE L'IMPACT DES GÈNES  
QU'ILS RÉGULENT SUR LA BIOLOGIE DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* 630**

Par

**ERICH SMITH-PETER**

mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, septembre 2015

Le 1er septembre 2015,  
*le jury a accepté le mémoire de Monsieur Erich Smith-Peter dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Daniel Lafontaine  
Directeur de recherche  
Département de biologie

Professeur Louis-Charles Fortier  
Codirecteur de recherche  
Département de microbiologie et d'infectiologie

Professeur Sébastien Rodrigue  
Évaluateur interne  
Département de biologie

Professeur Vincent Burrus  
Président-rapporteur  
Département de biologie

## SOMMAIRE

Les organismes unicellulaires sont très vulnérables aux changements rapides de leur environnement puisqu'ils sont en contact direct avec celui-ci. Les organismes unicellulaires utilisent plusieurs stratagèmes pour réguler l'expression génique et par conséquent, les diverses voies métaboliques nécessaires aux différentes conditions environnementales auxquelles ils sont confrontés. On sait maintenant que certains ARN, dont les riborégulateurs, ont également un grand rôle à jouer dans les processus de régulation de l'expression du génome. En général, les riborégulateurs sont des éléments génétiques situés dans les régions 5' non traduites (5' UTR) de l'ARN messager bactérien. Ces éléments possèdent une structure tertiaire bien définie qui est conservée à travers l'évolution. Les riborégulateurs subissent un changement de conformation en s'associant à un ligand spécifique et modulent l'expression des gènes qu'ils contrôlent en aval.

Le rôle des riborégulateurs en relation avec le métabolisme des eubactéries peut être d'une grande importance. C'est le cas de *Clostridium difficile* qui voit son génome régulé par au moins une quarantaine de riborégulateurs. Étant un pathogène nosocomial, causant des infections contractées dans le milieu hospitalier, bien connu pour engendrer des complications au niveau de l'intestin, il est intéressant d'étudier la relation gène-riborégulateur-métabolisme chez *C. difficile*. De plus, les riborégulateurs ont montré un potentiel intéressant comme cible antibiotique pour combattre certaines infections. *C. difficile* possède quatre riborégulateurs guanine transcriptionnels qui contrôlent quatre gènes intervenant dans la voie de biosynthèse de la guanosine monophosphate (GMP). Deux de ces gènes interviennent directement dans la voie de synthèse du GMP soit une guanosine-monophosphate synthase (*guaA*) et une xanthine phosphoribosyltransférase (XPRTase) (*xpt*) ainsi que deux transporteurs de précurseur nommés *CD630\_21070* codant pour une perméase uracile/xanthine et *CD630\_27040* une

perméase putative. Bien que quelques études ont démontré l'importance que pourrait avoir le gène *guaA* chez d'autres espèces bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus suis* et, *Salmonella typhimurium*), aucune étude de *C. difficile* n'a élucidé la relation entre les quatre riborégulateurs guanine et les gènes qu'ils contrôlent, de même que leur rôle au sein du métabolisme du GMP dans un contexte *in vivo*.

Le présent mémoire porte sur l'étude de ces quatre riborégulateurs guanine chez *C. difficile*, les gènes régulés par ces riborégulateurs et leurs effets sur la biologie de *C. difficile*. Une fois que les recherches bio-informatiques ont été entreprises, le projet s'est divisé en deux grandes parties soit l'efficacité de régulation des riborégulateurs guanine et l'importance des quatre gènes qui sont sous le contrôle de ces riborégulateurs chez *C. difficile* 630. Afin de vérifier si les riborégulateurs guanine avaient une affinité acceptable pour leur ligand (guanine), des essais de cartographies chimiques ont été faits et des  $K_d$  ont été déterminés. Ces  $K_d$  se retrouvent tous dans le bas nanomolaire (nM) de  $2,61 \pm 1,29$  nM pour le riborégulateur *guaA* et des  $K_d$  de  $1,78 \pm 0,95$  nM, de  $3,06 \pm 0,29$  nM et de  $4,44 \pm 2,75$  nM pour les riborégulateurs *xpt*, *CD\_21070* et *CD\_27040* respectivement. Pour la deuxième partie du projet, quatre mutants d'inactivation de gène par insertion ont été conçus grâce à l'utilisation du système ClosTron. Ces quatre mutants, correspondant aux gènes *guaA*, *xpt*, *CD630\_21070* et *CD630\_27040*, ont ensuite été analysés lors d'essais de croissance afin de vérifier les phénotypes associés aux inactivations de gènes. À la suite des résultats d'essais de croissance des divers mutants d'inactivation, une emphase a été mise sur le gène *guaA* et son riborégulateur puisque ce dernier montrait un phénotype d'inhibition de croissance. L'efficacité avec laquelle le riborégulateur *guaA* pouvait réprimer l'expression génique a été déterminée lors des essais de gène rapporteur *gusA* et de PCR quantitative en temps réel. Une baisse de l'expression ligand-dépendante a été observée dans des conditions variant en concentration de guanine. Le mutant de délétion par inactivation du gène *guaA* a aussi démontré une baisse dans sa capacité d'infecter un modèle murin. En effet, lors d'une étude d'infection en compétition avec le type sauvage, les décomptes cellulaires du mutant *guaA*

étaient diminués de 4 logs. Ces résultats indiquent un rôle fondamental du gène *guaA* sur le pouvoir infectieux de *C. difficile* 630 et mettent en évidence l'importance du riborégulateur qui contrôle l'expression de ce gène. Toutes les expériences faites dans le cadre du projet ont été entreprises chez *C. difficile* 630 afin de garder un contexte plus naturel au cours des analyses. Les résultats présentés ici mettent en évidence le potentiel des riborégulateurs comme cibles antibiotiques. Des travaux futurs devront être effectués afin de vérifier l'effet que pourraient avoir certains analogues de ligands qui ciblent les riborégulateurs guanine sur la viabilité de *C. difficile*.

Mots clés : *Clostridium difficile*, guanine, riborégulateur, ARN, GMP, Clostron, RT-qPCR, *guaA*

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mes directeurs de recherche, les Drs Daniel Lafontaine et Louis-Charles Fortier, pour m'avoir fait confiance et accueilli dans leur laboratoire respectif. Merci d'avoir été aussi disponible pour répondre à mes nombreuses questions et de m'avoir épaulé dans ma démarche scientifique. Ce fut une expérience très enrichissante qui m'a permis de m'épanouir tant d'un point de vue professionnel que personnel.

Je tiens également à remercier mes conseillers, les Drs Vincent Burrus et Sébastien Rodrigue pour leur disponibilité et leur intérêt pour le projet. Merci d'avoir contribué à l'avancement de mon projet de maîtrise par vos commentaires et suggestions d'expériences. Merci aussi d'avoir su me conseiller relativement à mes divers séminaires et présentations. Votre aide a grandement contribué à l'amélioration de la qualité de mes présentations.

Accomplir mon projet de maîtrise n'aurait pas été possible sans tout le soutien que j'ai reçu de mes collègues, famille et amis. Je tiens à remercier Oggy, Sébastien, Maxime, Julian, Sofiane, Nancy, Manu, Anne-Marie, Patrick, Laurène, Dave, David, Francesco, Émilie, Fatima, Laurent, Mizanur, Marc-André, Mathieu, Bob, Adamy, Mélanie, Adrien, Antony, Marie-Pierre et Audrey. Chacun d'entre vous a su m'éclairer quant à la méthodologie scientifique soit technique ou bien théorique. À mes yeux, vous feriez tous d'excellents professeurs. Je vous remercie aussi pour votre soutien moral dans les hauts comme les bas tout au long de ces trois dernières années.

Je voudrais aussi remercier *Grand River Post Secondary Education Office* (GRPSEO), Caroline Boutin, Eric Bélanger, Mathieu Richer et ma famille pour leur aide financière et leur appui moral, ce qui m’a permis de réussir mes années d’études.

Je remercie les organismes qui ont contribué au financement de mes études tels le ministère du Développement économique, de l’Innovation et de l’Exportation (MDEIE), les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), le Conseil de recherches en sciences naturelles et en Génie (CRSNG) et le Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQNT).



## TABLES DES MATIÈRES

SOMMAIRE .....	IV
REMERCIEMENTS .....	VII
TABLES DES MATIÈRES .....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIV
LISTE DES TABLEAUX.....	XVIII
LISTE DES FIGURES .....	XIX
 CHAPITRE 1 - INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	 1
1.1 <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i> .....	1
1.1.2. Caractéristiques générales de <i>Clostridium difficile</i> .....	2
1.1.3. Virulence et caractère pathogène .....	3
1.1.3.1. Facteurs de virulence de <i>Clostridium difficile</i> .....	4
1.1.3.2. Protéines de virulence .....	5
1.1.4. Effets sur la santé .....	6
1.1.5. Traitements.....	7
1.1.6. <i>Clostridium difficile</i> 630 .....	8
1.2. EXPRESSION GÉNIQUE ET LES RIBORÉGULATEURS .....	10
1.2.1 Classement et nomenclature des riborégulateurs .....	13
1.2.2. Structure générale des riborégulateurs .....	13
1.2.3. Régulation de l'expression génique par les riborégulateurs .....	16
1.2.4. Mécanismes de régulation des riborégulateurs .....	19
1.2.4.1. Riborégulateurs transcriptionnels .....	20
1.2.4.2 Riborégulateurs traductionnels .....	21
1.2.5. Gènes, voies de biosynthèse et riborégulateurs .....	23

1.3 LES RIBORÉGULATEURS GUANINE DE <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i> 630 .....	24
1.3.1. Contrôle de l'expression génique par les riborégulateurs guanine de <i>C. difficile</i> 630 .....	26
1.3.2. Implication des riborégulateurs dans la voie de biosynthèse du GMP chez <i>C. difficile</i> 630 .....	27
1.3.3 Implication des gènes sous contrôle des riborégulateurs guanine .....	28
1.4. IMPORTANCE DE LA RECHERCHE CONTRIBUANT À LA DÉCOUVERTE DE NOUVELLES MOLECULES THÉRAPEUTIQUES .....	29
1.4.1. Résistance bactérienne .....	30
1.5. OBJECTIFS DU PROJET DE MAÎTRISE .....	31
 CHAPITRE 2 - ARTICLE .....	34
 2.1. RÉSUMÉ DE L'ARTICLE .....	34
2.2 MANUSCRIT .....	34
INACTIVATION OF THE RIBOSWITCH-CONTROLLED GMP SYNTHASE <i>GUAA</i> IN <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i> IS ASSOCIATED WITH SEVERE GROWTH DEFECTS AND POOR INFECTIVITY IN A MOUSE MODEL OF INFECTION .....	35
Abstract .....	36
Introduction .....	36
Materials and methods .....	41
Bacterial strains and growth conditions .....	41
Gene inactivation and complementation in <i>C. difficile</i> .....	42
Growth curve experiments .....	42
In-line probing assays .....	43
Quantification of gene expression by RT-qPCR .....	43
GusA reporter assays .....	44
Determination of <i>C. difficile</i> competitiveness in a mouse model of infection .....	45

Results .....	46
Inactivation of the GMP synthase in <i>C. difficile</i> leads to medium-dependent growth defects.....	46
The expression of <i>guaA</i> is controlled by a functional riboswitch with high affinity for guanine .....	49
Guanine and related metabolites trigger riboswitch-mediated differential gene expression in <i>C. difficile</i> .....	52
Inactivation of <i>guaA</i> is associated with poor survival and infectivity in a mouse model of infection.....	55
Discussion.....	57
Aknowledgements .....	60
References .....	60
SUPPLEMENTARY INFORMATION .....	64
SUPPLEMENTARY TABLES .....	64
Tableau 2 : Supplementary Table 1. Strains and plasmids used in this study.....	64
Tableau 3 : Supplementary Table 2. Primers used in this study .....	65
SUPPLEMENTARY FIGURES.....	66
Figure 15 : Supplementary figure 1. Growth of WT and <i>guaA</i> mutant strains on BHIS agar .....	66
Figure 16 : Supplementary figure 2. In-line probing assays .....	67
Figure 17 : Supplementary figure 3. Schematic representation of the constructions used for the <i>GusA</i> reporter assays .....	68
Figure 18 : Supplementary figure 4. Functionality of the <i>xpt</i> , <i>CD630_21070</i> , and <i>CD630_27040</i> riboswitches determined by reporter assays .....	69

CHAPITRE 3 - DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION .....	70
3.1. Rappel des objectifs du projet .....	70
3.2. Les riborégulateurs guanine chez <i>C. difficile</i> 630 détectent la guanine avec une haute affinité.....	71
3.3. Contrôle de l'expression des gènes par les riborégulateurs guanine chez <i>C. difficile</i> 630 .....	73
3.3.1. La guanine baisse les niveaux d'activité enzymatique de la Bêta-glucuronidase sous contrôle d'un riborégulateur guanine <i>guaA</i> chez <i>C. difficile</i> 630 .....	74
3.3.2. L'ajout de guanine dans les milieux de culture minimal de <i>C. difficile</i> 630 augmente les concentrations cellulaires de guanine et baisse les niveaux d'expression de l'ARNm des gènes contrôlés par les riborégulateur guanine .....	77
3. 4. Importance des gènes régulés par les riborégulateurs guanine .....	78
3.4.1. Impact des mutants d'inactivation de gène par insertion sur la croissance bactérienne.....	78
3.4.2. Impact du mutant d'inactivation par insertion <i>guaA</i> sur le pouvoir infectieux de <i>C. difficile</i> 630.....	80
Conclusion .....	81
ANNEXES .....	83
Figure supplémentaire 1. Alignement de séquences du riborégulateur <i>guaA</i> de <i>C. difficile</i> 630, M68, 196, R20291 et M120 .....	83
Figure supplémentaire 2. Alignement de séquences du riborégulateur <i>xpt</i> de <i>C. difficile</i> 630, M68, 196, R20291 et M120 .....	83
Figure supplémentaire 3. Alignement de séquences du riborégulateur <i>CD_21070</i> de <i>C. difficile</i> 630, M68, 196, R20291 et M120.....	84

Figure supplémentaire 4. Alignement de séquences du riborégulateur <i>CD_27040</i> de <i>C. difficile</i> 630, M68, 196, R20291 et M120.....	84
BIBLIOGRAPHIE .....	85

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNnc	Acide ribonucléique non-codant
ARNP	Acide ribonucléique polymérase
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BHI	Brain Heart Infusion
BHIS	Brain Heart Infusion Supplemented
°C	Degré Celsius
CA	California
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Cyclic desoxyribonucleic acid
CFU	Colony forming unit
CIHR	Canadian Institutes for Health Research
Cl	Chlore
CO <sub>2</sub>	Gaz carbonique
CN	Chloramphénicol, Norfloxacin
CRCHUS	Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
Fig	Figure
FMN	Flavine mononucléotide

FRQS	Fonds de recherche du Québec - Santé
G	Guanosine
(G)	Guanine
g	Gramme
GDP	Guanosine diphosphate
GEMM	Genes related to the environment, membranes and motility
GMP	Guanosine monophosphate
GRPSEO	<i>Grand River Post Secondary Education Office</i>
GTP	Guanosine triphosphate
H	Hydrogène
HEPA	High Efficiency Particulate Air
ICD	Infection à <i>Clostridium difficile</i>
IMP	Inosine monophosphate
INSDC	International Nucleotide Sequence Database Collaboration
K	Potassium
kDa	kiloDalton
LB	Luria-Bertani
LGFUS	Laboratoire de génomique fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke
Log	Logarithme
M	Molaire
MCS	Multiple cloning site
MDEIE	Ministère du Développement économique, de l'Innovation et de l'Exportation
MDM	Minimal defined medium
MDM-T	Minimal defined medium supplemented with threonine
Mg	Magnésium
MHBCA	Muller Hinton Broth cation adjusted
mL	millilitre
MMAP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
mol	Mole

MTZ	Métronidazole
N	Azote
<i>n</i>	nano ( $10^{-9}$ )
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NR	Not reacted
NSERC	Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada
O	Oxygène
OD	Optic density
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P	Phosphore
<i>p</i>	Pico ( $10^{-12}$ )
PaLoc	Pathogenicity Locus
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PC1	Pyrimidic compound 1
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potentiel hydrogène
PNAS	Proceedings of the National Academy of science
Pre-Q1	Pre-queuosine 1
Qc	Québec
RBS	Ribosome binding site
RNA	Ribonucleic acid
RNAseq	Ribonucleic acid sequencing
RPKM	Reads per kilobase per million mapped reads
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RT-qPCR	Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction
SAM	S-adénosyl-méthionine
SD	Shine-Delgarno
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment



SLP	Surface layer proteins
Tab	Tableau
TAG	Taurocholic acide + Glycine
TP	Thiamine phosphate
TPP	Thiamine pyrophosphate
TY	Tryptone Yeast
TYRS	Tyrosyl-tRNA synthetase
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UTR	Untranslated region
VAN	Vancomycine
VRE	Vancomycine resistant <i>Enterococci</i>
WT	Wild type
XMP	Xanthine monophosphate
$\beta$	Bêta
$\mu$	Micro ( $10^{-6}$ )
$^{32}\text{P}$	Isotope radioactif de phosphore

## LISTE DES TABLEAUX

1. Riborégulateur de <i>C. difficile</i> 630 .....	9
2. Supplementary Table 1. Strains and plasmids used in this study .....	64
3. Supplementary Table 2. Primers used in this study .....	65

## LISTE DES FIGURES

1. Locus de pathogénicité .....	5
2. Schéma de la localisation des éléments d'un riborégulateur et concept d'inhibition d'expression du gène en aval .....	12
3. Structure et interactions moléculaires du riborégulateur guanine <i>xpt</i> de <i>B. subtilis</i> .....	15
4. Notions de terminateur / séquestrateur, antiterminateur et anti-séquestrateur.....	18
5. Mécanismes de régulation des riborégulateur transcriptionnels et traductionnels .....	22
6. Métabolisme du GMP chez <i>C. difficile</i> et relation avec les riborégulateurs guanine .....	25
7. Antibiotiques : conception et résistance .....	31
8. Schematic representation of the structure of a riboswitch .....	38
9. Simplified metabolic view of the metabolism of purines and GMP biosynthesis in <i>C. difficile</i> .....	39
10. Growth of wild type (WT) and mutant <i>C. difficile</i> strains in different conditions .....	48
11. In silico analysis of the guanine riboswitches in <i>C. difficile</i> . .....	50
12. In-line probing with the <i>guaA</i> riboswitch .....	51
13. Functionality of the <i>guaA</i> riboswitch determined by RT-qPCR and reporter assays .....	54
14. Impact of <i>guaA</i> inactivation in the mouse model of <i>C. difficile</i> infection .....	56
15. Supplementary figure 1. Growth of WT and <i>guaA</i> mutant strains on BHIS agar.....	66
16. Supplementary figure 2. In-line probing assays .....	67
17. Supplementary figure 3. Schematic representation of the constructions used for the <i>GusA</i> reporter assays .....	68
18. Supplementary figure 4. Functionality of the <i>xpt</i> , <i>CD630_21070</i> , and <i>CD630_27040</i> riboswitches determined reporter assays .....	69

## ANNEXES

Figure supplémentaire 1. Alignement de séquences du riborégulateur <i>guaA</i> de <i>C. difficile</i> 630, M68, 196, R20291 et M120 .....	83
Figure supplémentaire 2. Alignement de séquences du riborégulateur <i>xpt</i> de <i>C. difficile</i> 630, M68, 196, R20291 et M120 .....	83
Figure supplémentaire 3. Alignement de séquences du riborégulateur <i>CD_2107</i> de <i>C. difficile</i> 630, M68, 196, R20291 et M120 .....	84
Figure supplémentaire 4. Alignement de séquences du riborégulateur <i>CD_2704</i> de <i>C. difficile</i> 630, M68, 196, R20291 et M120 .....	84

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

#### 1.1 *Clostridium difficile*

Bien que depuis 2003, on rapporte une diminution globale des infections nosocomiales (infections provenant du milieu hospitalier), une augmentation importante des infections au *Clostridium difficile* (ICD) et une hausse du taux de mortalité ont été observées mondialement (Cohen *et al.*, 2010). Selon une étude effectuée en 2010 plus de 14 000 personnes sont décédées d'ICD et aux États-Unis, les coûts associés ont été estimés à plus de 3,2 milliards de dollars par année (Cohen *et al.*, 2010). Les spores de *C. difficile* sont très résistantes aux environnements hostiles et aux désinfectants. Elles sont susceptibles d'être responsables de la diffusion efficace de *C. difficile* en milieu hospitalier (Fawley *et al.*, 2007; Wilcox et Fawley, 2000). En outre, il existe des souches résistantes à tous les antibiotiques connus comprenant le métronidazole (MTZ) et la vancomycine (VAN) (Baines *et al.*, 2009). L'étude de la biologie de *C. difficile* est importante, car elle procure de nouvelles pistes de recherche pour contrer ses infections et diminuer le nombre de personnes qui en sont atteintes. Bien que le genre *Clostridium* comprend des espèces moins pathogènes comme *Clostridium acetobutylicum* ou *Clostridium butyricum*, on trouve aussi parmi ce genre, des espèces ayant des effets néfastes sur la santé lors d'infection, notamment *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium tetani* (Barra-Carrasco et Paredes-Sabja, 2014; Genth *et al.*, 2008; Huang et Sarker, 2006; Raffestin *et al.*, 2004). Par contre, *Clostridium difficile*, maintenant appelée *Peptoclostridium difficile*, possède des caractéristiques distinctes des espèces du même genre (Yutin et Galperin 2013; Ludwig W *et al.*, 2009). De plus, la connaissance sur les riborégulateurs, les gènes régulés

par ces derniers et leurs effets sur la biologie de *C. difficile* demeure à ce jour encore minimale.

### **1.1.2. Caractéristiques générales de *Clostridium difficile***

*Clostridium difficile* est un pathogène entraînant des complications au niveau du tractus intestinal chez l'humain (Borriello, 1990). C'est un bacille à Gram positif, possédant des flagelles péritriches, pouvant être retrouvé sous la forme sporulée et possédant un génome avec un pourcentage G+C faible (Monaghan, 2015). *C. difficile* est une bactérie anaérobie stricte qui utilise diverses sources de carbone en fonction de son environnement, par exemple, lorsqu'elle aura infecté le tractus gastro-intestinal d'un hôte (Brazier et Duerden, 1998; Rodriguez-Palacios *et al.*, 2007). Son nom provient du terme grec «klostri» signifiant «*spindle*» ou fuseau en français, tandis que le terme *difficile* désignant l'espèce témoigne des grandes difficultés éprouvées lors de l'isolement en laboratoire et de sa croissance très lente en milieu de culture. *C. difficile* est un pathogène entérique qui se contracte par la voie fécale-orale. Ingéré au niveau du tractus intestinal, il élira domicile dans l'intestin et le colon (Francis *et al.*, 2013). On lui confère un caractère nosocomial opportuniste (Cohen *et al.*, 2010). Son caractère nosocomial lui est conféré par le pourcentage élevé d'infections à *C. difficile* contractées en milieu hospitalier. Le terme opportuniste vient de sa capacité d'infecter un individu immunodéficient ou lors d'une altération du microbiote. L'infection par cette bactérie se fait généralement lorsque la flore intestinale bactérienne normale est affectée par la prise d'antibiotiques dans le contexte du traitement d'une infection (Ferreira *et al.*, 2014; Haran *et al.*, 2014; Surawicz, 2015). La prise d'antibiotiques à large spectre élimine la majeure partie des bactéries commensales du microbiote laissant les spores résistantes de *C. difficile* intactes et libres de compétition (Johnson and Gerding, 1998). Une infection à *C. difficile* engendre des complications dans les milieux hospitaliers et les patients

qui contractent cette infection peuvent montrer des signes cliniques sévères (See *et al.* 2014; Gweon *et al.* 2015).

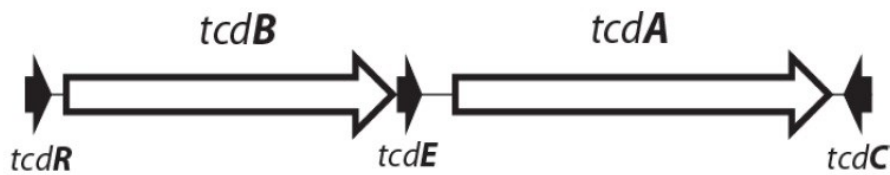
### 1.1.3. Virulence et caractère pathogène

La virulence de *C. difficile* varie en fonction des souches (c'est-à-dire de la présence ou de l'absence de facteurs de virulence encodés par la bactérie), de la personne infectée et de l'état du microbiote de la personne. En effet, la cause de cas sévères chez certains patients reste encore aujourd'hui ambiguë puisqu'il n'y a pas de lien direct entre la souche de *C. difficile* et la sévérité de l'infection (Burns *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2009; Sirard *et al.*, 2011). Ainsi, on retrouve chez des patients infectés par des souches virulentes, des cas d'infections qui seront très problématiques et d'autres qui ne seront pas aussi néfastes, voire asymptomatiques. Tout de même, *C. difficile* est perçue comme l'une des principales causes de diarrhées associées aux antibiotiques chez les patients hospitalisés (Ferreira *et al.* 2014; Ludwig W *et al.* 2009). Selon le CDC (*Center for Disease Control and Prevention*), elle est également classée comme la menace la plus urgente, car, outre son caractère opportuniste, elle est également résistante à certains antibiotiques couramment utilisés contre d'autres types d'infections. En effet, des tolérances accrues à d'autres antibiotiques ont été rapportées chez *C. difficile* notamment à l'érythromycine, (Schmidt *et al.*, 2007) à la clindamycine, (Schmidt *et al.*, 2007) à la rifampine (Curry *et al.*, 2009) ainsi qu'à la tétracycline et au chloramphénicol. (Spigaglia et Mastrantonio, 2004) L'acquisition des résistances aux antibiotiques peut avoir comme effet l'augmentation de la propagation de *C. difficile* en milieu hospitalier (Samore *et al.*, 2006). Parmi les solutions discutées, certains étudient l'élaboration de molécules thérapeutiques ciblant spécifiquement *C. difficile* ou la conception d'antibiotiques à spectre plus restreint laissant la majeure partie du microbiote intacte (Ferreira *et al.*, 2014; Haran *et al.*, 2014; Surawicz, 2015).

#### 1.1.3.1. Facteurs de virulence de *Clostridium difficile*

*C. difficile* produit deux toxines majeures parmi les plus volumineuses du règne bactérien, soit les toxines A (TcdA, 308 kDa) et B (TcdB, 270 kDa) (Genth *et al.*, 2008). Toutes deux sont des glucosyltransférases (Voth et Ballard, 2005) qui modulent de nombreuses activités cellulaires, notamment par la glycosylation de protéines régulatrices de la superfamille Ras (He *et al.*, 2002) et de GTPases monomériques (Sun et Hirota, 2015). Bien que le rôle de chacune des toxines demeure vague, la toxine A aurait un effet davantage inflammatoire et la toxine B, un pouvoir cytotoxique. Les gènes des deux toxines (*tcdA* et *tcdB*) se trouvent sur un locus de pathogénicité (PaLoc) (Fig. 1). Sur ce dernier, on retrouve également un gène codant pour un régulateur positif (TcdR) et négatif (TcdC). La synthèse des toxines est dépendante de la phase de croissance bactérienne ainsi que de divers signaux externes, incluant la température, la présence de glucose ou certains acides aminés, l'acide butyrique et certains antibiotiques (Emerson *et al.*, 2008; Gerber *et al.*, 2008; Voth et Ballard, 2005). Le régulateur positif TcdR est un facteur  $\sigma$  alternatif qui régule positivement l'expression des gènes de toxines ainsi que l'expression de son propre gène (Dupuy *et al.*, 2008). L'expression des toxines TcdA et TcdB ainsi que le régulateur positif TcdR se fait lorsque la bactérie atteint la phase stationnaire et sert à diminuer la compétition bactérienne dans son environnement et à augmenter la concentration de nutriments accessibles. À l'opposé, le régulateur négatif TcdC est exprimé durant la phase exponentielle. Finalement, un gène codant pour une protéine (TcdE) est situé entre *tcdA* et *tcdB* (Fig. 1). Le fait que les toxines de *C. difficile* ne possèdent pas de peptide-signal permettant leur sécrétion suggère que TcdE y joue un rôle au niveau de la perméabilité membranaire, ou du moins facilite la sécrétion, et serait similaire aux protéines Holin de phages (Govind et Dupuy, 2012).





**Figure 1 : Locus de pathogénicité.** Représentation schématique du locus de pathogénicité (PaLoc) de *C. difficile* (environ 19 Kb).

#### 1.1.3.2. Protéines de virulence

Outre les toxines A et B qui constituent les principaux facteurs de virulence, on dénombre plusieurs autres gènes qui semblent intervenir à diverses étapes de la pathogenèse. L'étape préliminaire d'adhésion se fait via les protéines de surface cellulaire (SLPs, *surface layer proteins*) (Calabi *et al.*, 2002; Karjalainen *et al.*, 2001; Waligora *et al.*, 2001). Le rôle de motilité attribué à *C. difficile* est donné aux flagelles (*fliC*, *fliD*) qui en plus de jouer ce rôle, interviennent dans l'adhésion (Barketi-Klai *et al.*, 2014; Dingle *et al.*, 2011; Tasteyre *et al.*, 2001). Bien que la fonction de la capsule pour l'infection de *C. difficile* n'ait pas encore été comprise, on peut supposer qu'elle joue un rôle important quant à la virulence comme c'est le cas chez d'autres bactéries pathogènes (Hoo *et al.*, 2014; de Vos *et al.*, 2015). De plus, plusieurs enzymes hydrolytiques et protéolytiques sont exprimés à divers stades de la pathogenèse causant une mort cellulaire bénéfique au genre *Clostridium* par l'apport en nutriments causé par la lyse cellulaire. De récentes études ont également été menées sur la toxine binaire CDT. La toxine binaire exhibe une activité d'actine-ADP-ribosyltransférase qui a pour conséquence l'inhibition de la polymérisation des monomères d'actine (Gonçalves

*et al.*, 2004; Unger *et al.*, 2015). Cette activité serait impliquée dans l'adhésion non spécifique.

#### **1.1.4. Effets sur la santé**

L'acquisition de *C. difficile* se fait par voie orale, par ingestion de spores qui résistent à l'acidité gastrique. Ces spores traversent tout le tractus intestinal n'évoluant en formes végétatives plus sensibles qu'après l'estomac et grâce aux sels biliaires (germinants) qui se lient au récepteur de germination CspC, ils élisent domicile dans l'intestin et le colon (Francis *et al.*, 2013). C'est là que *C. difficile* se reproduit et colonise les parois épithéliales de l'intestin. Les manifestations cliniques d'une colonisation massive de l'épithélium entérique par le pathogène se présentent sous forme de douleurs abdominales, diarrhées et vont jusqu'aux symptômes plus sévères tels que les perforations, les péritonites, les colites pseudomembraneuses, le mégacôlon toxique et même la mort (See *et al.* 2014; Gweon *et al.* 2015). Les conséquences sur la santé d'une infection à *C. difficile* sont issues de la sécrétion des toxines A et B, ainsi que d'autres protéines de virulence, tel que discutées précédemment. Ces toxines sont nocives pour l'épithélium intestinal (jonctions serrées) et vont détruire ces derniers, déclenchant la réponse inflammatoire par la cytokine interleukin-23 (IL-23) et d'autres mécanismes de réponse aux infections comme les motifs moléculaires associés aux pathogènes (MAMP ou « *PAMP s* ») (Cowardin *et al.*, 2015).

L'un des problèmes majeurs rencontrés chez les patients qui ont subi une infection à *C. difficile* est la forte possibilité de récurrence (8 à 50 %) et la probabilité de récurrence augmente avec le nombre d'épisodes ICD (Aslam *et al.*, 2005; McFarland *et al.*, 2002). La cause du fort pourcentage de rechute chez les patients infectés par *C. difficile* est le manque de traitements spécifiques. En effet, lors d'une prise d'antibiotique pour contrer l'infection

par *C. difficile*, l'élimination des cellules végétatives se fait, mais il reste toujours des cellules de *C. difficile* sous forme de spores. Le traitement est donc efficace pour soulager les symptômes, par contre plusieurs bactéries du microbiote qui protègent l'intestin sont éliminées, ce qui entraîne une problématique. Les spores de *C. difficile* demeurent insensibles aux antibiotiques à large spectre et dès lors, exemptes de compétition, elles peuvent recoloniser l'intestin plus aisément (Johnson et Gerding, 1998). Afin d'éliminer ce problème, il faudrait développer un antibiotique qui aurait une action spécifique contre *C. difficile* et qui n'éliminerait pas les bactéries plus bénéfiques retrouvées dans l'intestin. Cela aurait comme effet de maintenir une compétition pour les nutriments et diminuer les probabilités d'une colonisation massive par les spores restantes de *C. difficile*.

#### **1.1.5. Traitements**

Le traitement actuel est principalement axé sur l'utilisation de trois antibiotiques, soit le métronidazole, la vancomycine et la fidaxomicine (Gerding *et al.* 2008; Aslam *et al.* 2005). Cependant, des traitements supplémentaires tels que la normalisation d'électrolytes, le remplacement des fluides, l'injection intraveineuse d'immunoglobulines, l'injection intracolique de vancomycine ou encore la transplantation fécale peuvent s'avérer nécessaires (Halsey, 2008; Mathur *et al.*, 2015). La fidaxomicine, maintenant approuvée pour le traitement des infections contre *C. difficile*, avait donné des résultats plus probants pour contrer les rechutes (Scott, 2013). Par contre, les résultats parus depuis l'approbation de cet antibiotique sont discutables quant à leur réel avantage sur les traitements déjà utilisés en relation avec le risque de rechute (Sclar *et al.*, 2012). Les antibiotiques actuels utilisés comme traitement contre une infection à *C. difficile* manquent en spécificité et vont éliminer une grande partie des bactéries protectrices ou commensales du microbiote lors du traitement (Johnson et Gerding, 1998). Le spectre des antibiotiques utilisés est donc trop large.

### 1.1.6. *Clostridium difficile* 630

La souche 630 de *Clostridium difficile* possède 42 riborégulateurs répartis en 9 classes (Tableau 1). Elle possède aussi 19 T-box liant l'ARNt, qui sont eux aussi classés comme des riborégulateurs selon Rfam (*RNA families*). Cette souche utilisée lors de nos travaux a été choisie puisqu'elle a été l'objet d'une récente étude de transcriptomique (*RNAseq*) (Soutourina *et al.*, 2013). Les résultats d'expression des ARN des riborégulateurs guanine chez *C. difficile* 630 ont aidé à situer et à diriger nos recherches. En effet, puisque l'essai de transcriptomique a été effectué sur des ARNs provenant d'une culture de *C. difficile* 630, on a pu vérifier les niveaux d'expression des divers gènes sous le contrôle de riborégulateurs. Les résultats du groupe de Soutourina démontrent une baisse en RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*) des ARNs correspondant aux gènes *guaA*, *xpt* et *CD\_27040* et *CD\_21070* par rapport à leurs régions non traduites en 5' (5'UTR : région du riborégulateur). Cela indique une baisse de l'expression de la partie du gène sur l'ARNm. D'un aspect plus technique, plusieurs outils biotechnologiques retrouvés au Laboratoire Fortier ont permis d'entreprendre les essais voulus lors du projet de maîtrise sur *C. difficile* 630.

**Tableau 1 : Riborégulateurs de *C. difficile* 630. Diverses classes de riborégulateurs retrouvées chez *Clostridium difficile* 630 avec leur gène associé (sous contrôle du riborégulateur) et la fonction du gène selon NCBI et Rfam (*National Center of Biotechnology Information*)(*RNA families*)**

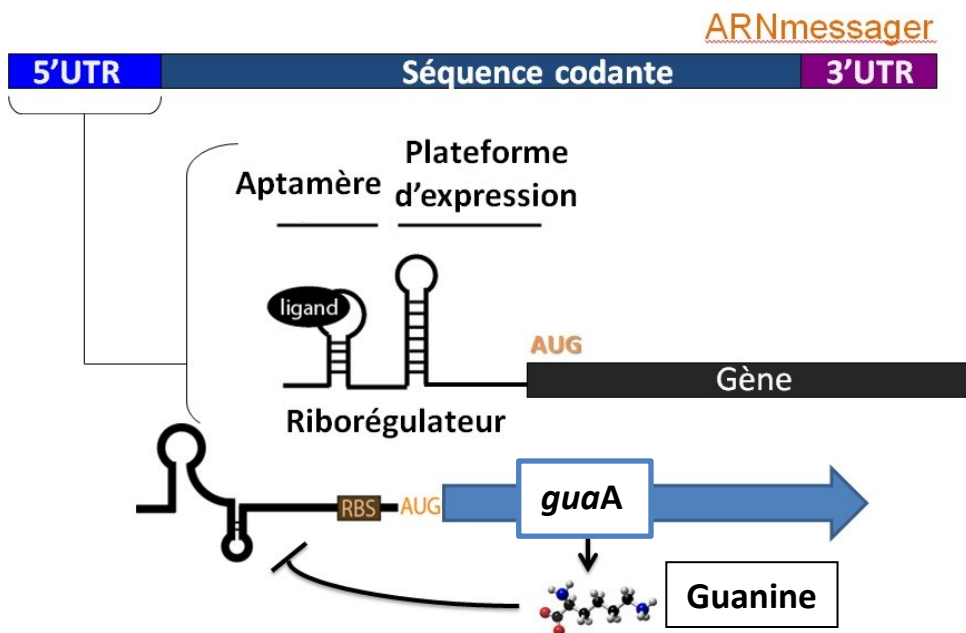
Souche	Riborégulateur	Gène régulé en aval NOM	Gène régulé en aval FONCTION
Clostridium difficile 630	purine	guaA	GMP synthase
Clostridium difficile 630	purine	xpt	Xanthine phosphoribosyltransferase (XPRTase)
Clostridium difficile 630	purine	CD2704	putative permease
Clostridium difficile 630	purine	CD2107	Xanthine/uracil permease
Clostridium difficile 630	TPP	thiC	Thiamine biosynthesis protein ThiC
Clostridium difficile 630	TPP	thiD	Phosphomethylpyrimidine kinase ThiD
Clostridium difficile 630	TPP	CD630_1980A	Conserved hypothetical protein DUF77 Family
Clostridium difficile 630	SAM	metK	s-adenosylmethionine synthetase
Clostridium difficile 630	SAM	metN	ABC type transporter system,
Clostridium difficile 630	SAM	hom1	homoserine dehydrogenase
Clostridium difficile 630	SAM	CD630_16530	putative probable D-methionine binding lipoprotein
Clostridium difficile 630	SAM	metY	O-acetylhomoserine sulfhydrylase
Clostridium difficile 630	Cobalamin	CD2999	iron ABC transporter substrate-binding protein
Clostridium difficile 630	Cobalamin	cblM	colbalamine biosynthetis protein
Clostridium difficile 630	Cobalamin	cobQ/ cblP	cobyric acid synthase,
Clostridium difficile 630	glycine	CD2276	sodium/alanine symporter family protein
Clostridium difficile 630	glycine	CD2276	sodium/alanine symporter family protein
Clostridium difficile 630	glycine	grdX	glycine reductase complex component
Clostridium difficile 630	Lysine	CD3100	C4 dicarboxylate-anaerobic carrier
Clostridium difficile 630	Lysine	CD1655	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter
Clostridium difficile 630	Lysine	CDs046 lysC	lysC aspartokinase
Clostridium difficile 630	Lysine	CDs061 asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase
Clostridium difficile 630	FMN	CD0147	riboflavin transporter
Clostridium difficile 630	FMN	ribD/CDs036	Riboflavin biosynthesis protein ribD "
Clostridium difficile 630	FMN	CD32990	transporter
Clostridium difficile 630	GEMM	flgB	Flagellar basal-body rod protein
Clostridium difficile 630	GEMM	CD2830	hypothetical protein
Clostridium difficile 630	GEMM	NO GENE	BEFORE TPP RIBOSWITCH (8)
Clostridium difficile 630	GEMM	CD2309	hypothetical protein
Clostridium difficile 630	GEMM	CD2517	regulatory protein
Clostridium difficile 630	GEMM	CD2797	hypothetical protein
Clostridium difficile 630	GEMM	cspC	cold shock protein
Clostridium difficile 630	GEMM	CD1424	hypothetical protein
Clostridium difficile 630	GEMM	CD3369	hypothetical protein
Clostridium difficile 630	GEMM	CD1990	hypothetical protein
Clostridium difficile 630	GEMM	CD2888	ABC transporter permease
Clostridium difficile 630	GEMM	NO GENE	
Clostridium difficile 630	C-di-GMP-II	CD2831	collagen-binding protein
Clostridium difficile 630	C-di-GMP-II	CD3246	surface protein
Clostridium difficile 630	C-di-GMP-II	CD3267	two-component response regulator
Clostridium difficile 630	C-di-GMP-II	CD3513	pilin

## 1.2. Expression génique et les riborégulateurs

La découverte en 2002 des riborégulateurs comme régulateurs de l'expression génique par l'ARNm a apporté un nouveau sujet de recherche sur la biochimie, la structure et la régulation de l'ARNm (Winkler *et al.*, 2002a). Avant la découverte des riborégulateurs, les aptamères d'ARN étaient des cibles attrayantes dans le domaine de la recherche sur les acides nucléiques, en raison de leur capacité à se lier sélectivement à une cible d'intérêt biotechnologique (ligand). Depuis le début des années 1990, la recherche s'est penchée sur ces aptamères d'ARN en utilisant l'Évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX), une technique servant à découvrir des molécules d'ARN qui se lient avec une grande affinité à un ligand spécifique ou avec des analogues de ligand avec une affinité moindre (Ellington et Szostak, 1990; Joyce, 1994). Peu après, on a constaté que des aptamères d'ARN (riborégulateurs) étaient naturellement présents en tant que régulateurs de gènes (Grundy *et al.*, 1994).

Le premier riborégulateur identifié a été le T-box, liant l'ARNt de *Bacillus subtilis*, retrouvé dans le 5' UTR du gène TYRS et codant pour une tyrosyl-ARNt synthétase. Dr Henkin et ses collègues (1994) ont constaté qu'un élément au sein de la région 5' UTR de l'ARNm liait un ARNt non chargé, conduisant à la formation d'une hélice de terminaison intrinsèque à l'ARNm, réduisant ainsi l'expression du gène par arrêt de transcription de la polymérase (Grundy *et al.*, 1994). Bien que ces études soient les premières à rapporter une régulation de la transcription de l'ARN par ce mécanisme, il n'était pas clair s'il s'agissait d'un motif unique ou d'un élément de régulation général. Quelques années plus tard, Winkler *et al.* (2002) ont repéré un élément de l'ARNm d'*Escherichia coli* pouvant lier des dérivés de la thiamine tels que le TPP (thiamine pyrophosphate). Cette liaison du TPP à l'ARNm changeait la conformation de la structure tertiaire de ce dernier, contraignant la région du Shine-Dalgarno ou du site de liaison ribosomique (RBS), réduisant ainsi l'expression de la protéine.

Ces ARNnc (acide ribonucléique non codants) se démarquent, parmi les ARNnc récemment répertoriés, comme les premiers exemples de régulation d'un gène par l'ARNm. Les riborégulateurs sont composés d'éléments régulateurs modulaires se retrouvant dans la région 5' non traduite (5' UTR) de l'ARNm et contrôlent l'expression de gènes par la reconnaissance d'un métabolite cellulaire. Les deux parties du riborégulateur remplissent des fonctions distinctes. L'aptamère reconnaît le ligand et la plateforme d'expression module l'expression génique. Cette liaison du métabolite à l'aptamère modifie la structure de la plateforme d'expression permettant d'activer ou de réprimer l'expression du gène situé en aval (Fig. 2). Les riborégulateurs sont capables de réprimer ou d'activer l'expression du gène associé en modulant plusieurs mécanismes de régulation, comme la transcription, la traduction, la demi-vie de l'ARNm et l'épissage alternatif (Caron *et al.*, 2012; Cheah *et al.* 2007; Bocobza et Aharoni 2014; Gusarov et Nudler 1999; Yarnell et Roberts 1999; Wachter *et al.* 2007; Gallo *et al.* 2008). Les riborégulateurs se retrouvent dans plusieurs domaines de vie : archaea (Barrick et Breaker, 2007), eubactéries (Bastet *et al.*, 2011) et eucaryotes (Cheah *et al.*, 2007; Thore *et al.*, 2006). Par contre, ils sont beaucoup plus présents chez les eubactéries où ils peuvent contribuer à 2 % de la régulation du génome (*B. subtilis*) (Mandal *et al.*, 2003). Cela leur confère l'une des caractéristiques nécessaires au développement d'agents thérapeutiques bactéricides. Ce mécanisme de régulation relativement nouveau vient augmenter l'importance de l'ARN au sein de la régulation cellulaire.



**Figure 2 : Schéma de la localisation des éléments d'un riborégulateur et concept d'inhibition d'expression du gène en aval.** L'aptamère et la plateforme d'expression se retrouvent dans le 5' UTR de l'ARNm en amont du gène. Le schéma représentant la rétro-inhibition du gène *guaA* par le produit de la voie de biosynthèse, montre un riborégulateur guanine qui réprime l'expression de *guaA* lors de la liaison à la guanine, qui est un sous-produit de la voie de biosynthèse dans lequel *guaA* intervient.



### 1.2.1 Classement et nomenclature des riborégulateurs

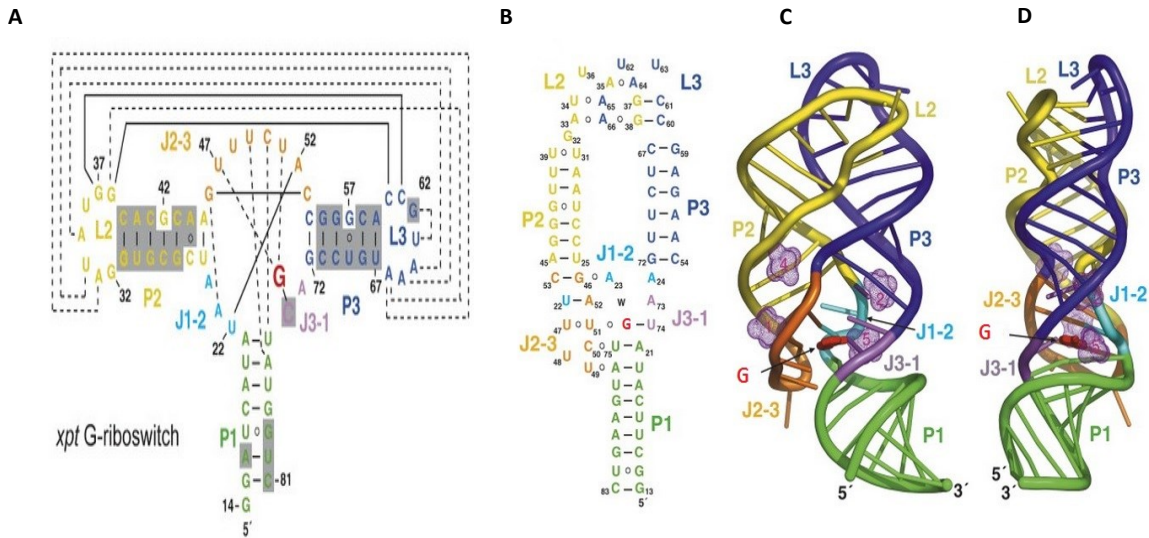
Depuis que les riborégulateurs détectant la thiamine pyrophosphate (TPP) ont été découverts en 2002 (Winkler *et al.* 2002), plus de 20 classes de riborégulateurs détectant d'autres ligands ont été répertoriées. Les riborégulateurs contrôlent un large éventail de gènes impliqués dans des voies de biosynthèses, de formation de biofilms, de transport cellulaire, de motilité ainsi que des gènes de virulence chez les bactéries (Bordeleau *et al.*, 2015; Fuchs *et al.*, 2006; Furukawa *et al.*, 2012; Groisman *et al.*, 2013; Merino et Gutie, 2012; Takemoto *et al.*, 2014). Il existe divers types de ligands et les riborégulateurs qui leur sont associés sont généralement classés selon la nature du ligand. Aujourd'hui, le terme riborégulateur inclut les ARNm qui répondent à une variété de signaux, y compris, mais sans s'y limiter, aux nucléotides (guanine, adénine, 2'-déoxyguanosine, cyclic-di-GMP, et PreQ1) (Batey *et al.*, 2004; Mandal et Breaker, 2004), acides aminés (lysine, glycine) (Blount *et al.*, 2007; Mandal *et al.*, 2004), quelques cofacteurs (cobalamine ou vitamine B12, S-adenosyl-méthionine, Tyrosine pyrophosphate, FMN) (Gallo *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2008, 2011; Roth et Breaker, 2009; Takemoto *et al.*, 2014; Winkler *et al.*, 2002a), le pH (Sudarsan *et al.*, 2006), la température (Kortmann *et al.*, 2011), les ions de métal (Dann *et al.*, 2007; Regulski *et al.*, 2008), et les ions fluorés (Baker *et al.*, 2012). Les riborégulateurs sont habituellement nommés d'après leur ligand et le gène qu'ils contrôlent. Ainsi, un riborégulateur ayant pour ligand la guanine et contrôlant le gène *guaA* chez *C. difficile* va être décrit comme le riborégulateur guanine *guaA* de *C. difficile*.

### 1.2.2. Structure générale des riborégulateurs

La structure du riborégulateur peut être décomposée en trois niveaux de base. Le premier est la séquence primaire qui est directement transcrite à partir de la matrice d'ADN. Le deuxième

niveau est la structure secondaire qui se forme principalement suite aux liaisons d'hydrogène entre deux ribonucléotides complémentaires (U-A, G-C). Puisqu'elles sont structurellement composées de ribonucléotides, les hélices d'ARN possèdent des caractéristiques différentes des hélices d'ADN. Un tour d'hélice d'ARN contient 11 pb versus 10,5 pb pour l'ADN et les sillons majeurs des hélices d'ARN sont plus profonds et étroits que ceux des hélices d'ADN (Lipfert *et al.*, 2014). En plus des tiges-boucles formées par les hélices d'ARNdb, on y retrouve d'autres éléments de structure et des motifs tels des bulles (*bulges*), des pseudonoeuds, des tétraboucles et des interactions triples (Xue *et al.*, 2015; Nozinovic *et al.*, 2014; Buck *et al.*, 2011; Haller *et al.*, 2013; Serganov *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2008; Santner *et al.*, 2012; Dann *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2013; Blouin *et al.*, 2011).

Le troisième niveau est associé au repliement dans l'espace de la structure d'ARN. La conformation tertiaire du riborégulateur résulte du positionnement global des tiges et des hélices d'ARN au sein d'une molécule d'ARNm ainsi que les interactions entre ces tiges et les divers motifs ou éléments de structure de l'ARN (Fig. 3A). La structure tertiaire des riborégulateurs est hautement dynamique et flexible (Thirumalai *et al.*, 2001; Tinoco et Bustamante, 1999). Des interactions moléculaires entre les diverses parties ou régions du riborégulateur vont donner un repliement natif au riborégulateur et assurer une stabilité de la structure tertiaire. Il existe diverses structures au sein de la molécule d'ARN soit les boucles (L2-L3), les tiges (P1-P2-P3), les motifs (ex : K-turn, K-loop, hernie ou «*bulges*»), les pseudonoeuds, les interactions triples et autres (Fig. 3B-C-D) (Blouin *et al.*, 2011). Ces structures seront stabilisées dans un état prédominant assurant la fonction du riborégulateur au moment de la liaison du ligand à la jonction centrale ou site de liaison (Serganov *et al.* 2004; Blouin *et al.* 2011).

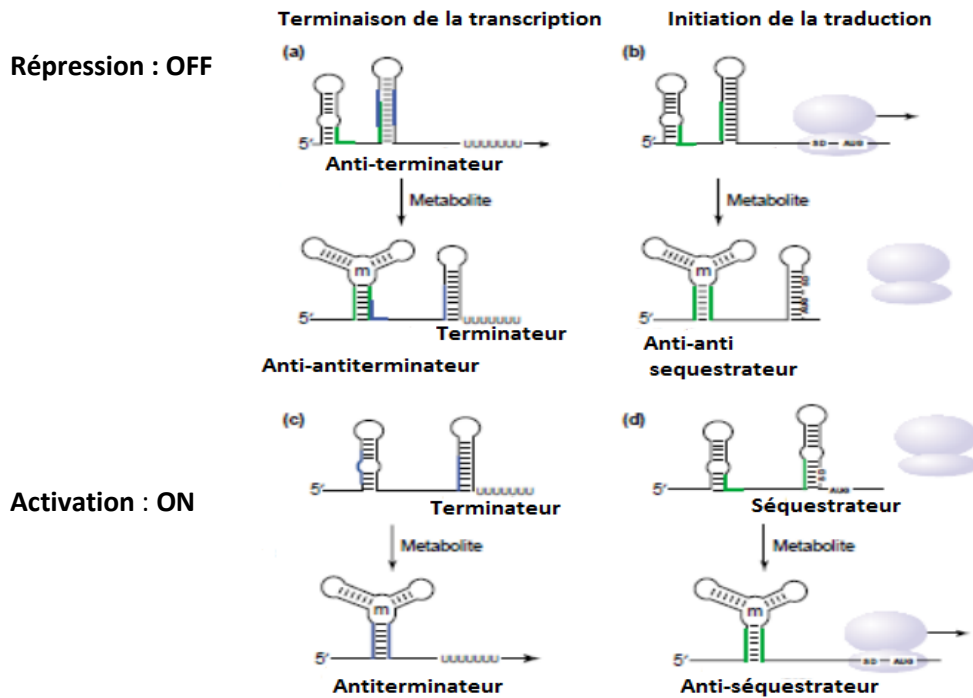


**Figure 3 : (adapté de Serganov *et al.* 2004). Structure et interactions moléculaires du riborégulateur guanine *xpt* de *B. subtilis*.** A) Séquence et structure consensus du riborégulateur guanine. Le système de codage couleur est le suivant : les tiges P1, P2 et P3 sont vert, jaune et bleu, respectivement. Les boucles L2 et L3 sont jaune et bleu, respectivement. Les segments de jonction reliant J1-2, J2-3 et J3-1 sont le cyan, l'or et le violet, respectivement. Le résidu de pyrimidine déterminant la spécificité à la position 74 est mis en évidence par une taille de caractère plus grande. La guanine liée à la jonction centrale est indiquée en rouge. Alignements d'appariement tertiaires Watson-Crick et paires de bases non canoniques sont représentées par des lignes continues et pointillées, respectivement. Les régions ombragées indiquent les différences de conservation entre le riborégulateur adénine et guanine. B) Schéma des interactions tertiaires dans la structure repliée du complexe riborégulateur-guanine. Le codage couleur est comme il est indiqué dans la partie A. C) Représentations en ruban (rotation de 90° sur l'axe vertical en D) du complexe riborégulateur guanine-guanine avec le même système de codage couleur (A et B). La guanine liée est affichée en rouge. Quatre des cinq cations  $Mg^{2+}$  hydratés sont présentés en mauve (les  $Mg^{2+}$  restants interviennent dans les interactions de repliement).

### 1.2.3. Régulation de l'expression génique par les riborégulateurs

L'aptamère des riborégulateurs est structuré de telle manière que des tiges se replient autour d'une jonction centrale (*junction core*) ou site de liaison, en formant des interactions tertiaires les unes avec les autres (Fig. 3) (Blouin *et al.*, 2011; Buck *et al.*, 2011; Dann *et al.*, 2007; Haller *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2008; Nozinovic *et al.*, 2014; Santner *et al.*, 2012; Serganov *et al.*, 2004a; Taylor *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2015). Des études récentes ont montré l'importance des interactions boucle-boucle et tige-boucle sur le repliement de la structure tertiaire du riborégulateur lysine *lysC* de *B. subtilis*. Le repliement de cette structure tertiaire est essentiel au bon positionnement et à la formation du site de liaison de la lysine (Blouin *et al.*, 2011). Généralement, la liaison du ligand au site de liaison stabilise la formation de la tige P1 (Nozinovic *et al.*, 2014). La tige P1 est habituellement partagée entre les deux parties du riborégulateur soit l'aptamère et la plateforme d'expression (Fig. 2). Dans le cas du riborégulateur transcriptionnel guanine *guaA* de *C. difficile*, le signal de liaison est communiqué à la plateforme d'expression en stabilisant sa conformation, créant un antiterminateur dans la tige P1. Cela assurera la formation d'une tige terminatrice au sein de la plateforme d'expression. Cette tige terminatrice fera décrocher l'ARN polymérase et il y aura arrêt de la transcription (Fig. 4A) (Kim et Breaker, 2008; Winkler, 2005). C'est le cas des riborégulateurs qui répriment l'expression en aval du gène lorsqu'il y a présence du ligand. Le cas contraire existe, où la liaison du ligand à l'aptamère forme une tige antiterminatrice empêchant la formation d'un terminateur et favorisant l'expression du gène (Fig. 4C). Plusieurs autres mécanismes de régulation peuvent être présents à l'intérieur de la plateforme d'expression du riborégulateur, notamment des tiges séquestratrices qui bloquent l'initiation de la traduction par le ribosome (Fig. 4B). Généralement, les riborégulateurs possèdent une structure dynamique qui change en conformation entre deux états prédominants (ON/OFF) (Blouin *et al.* 2011). Ces structures vont être consolidées par des ions (Hennelly *et al.*, 2013; Serganov *et al.*, 2008) et les états prédominants apparaîtront au moment de la stabilisation de la structure par la liaison du ligand (Blouin *et al.* 2011). La

structure utilisée par la plateforme d'expression varie entre chaque riborégulateur, même ceux de la même classe ou dans la même souche bactérienne. Par contre, ils servent tous à moduler l'expression de gènes et sont dictés par l'aptamère de façon ligand-dépendante. C'est par ce changement de structure que la plateforme d'expression prend une conformation dite «ON», pleine longueur ou «readthrough», activant la transcription/traduction du gène en aval. Dans le cas contraire, la conformation terminée «OFF» ou «*terminated*», empêchera cette transcription/traduction.



**Figure 4 : (adapté de Nudler *et al.* 2004). Notions de terminateur / séquestrateur, antiterminateur et anti-séquestrateur.** A) Répression génique par la terminaison de la transcription. Une tige terminatrice décrochant la polymérase à ARN est formée lorsque l'anti-antiterminateur (vert) se forme dans la tige P1 suite à la liaison du ligand. Une tige antiterminatrice (bleu) est formée en absence du ligand permettant la transcription du gène. B) Répression génique par le blocage de l'initiation de la traduction. Lors de la liaison du ligand il y a formation d'une tige anti-antiséquestratrice (vert) qui séquestre le site de liaison ribosomique (RBS) bloquant l'initiation de la traduction. C) Activation de l'expression génique par la formation d'un antiterminateur (bleu). Le terminateur est formé lorsque le riborégulateur adopte la conformation sans ligand. Lors de la liaison du ligand, une tige antiterminatrice (bleu) se forme dans la P1 et la transcription complète a lieu. D) Activation de l'expression génique par la formation d'une tige antiséquestratrice (vert). Le RBS est libéré lorsque le riborégulateur change de conformation OFF (sans ligand avec tige séquestratrice) à ON (avec ligand et tige antiséquestratrice).

#### 1.2.4. Mécanismes de régulation des riborégulateurs

Pour mieux comprendre la fonction biologique donnée par ces structures d'ARN et la régulation des gènes par les riborégulateurs, il est d'une grande importance d'étudier les changements de conformation et la dynamique de repliement encourus lors de la liaison du ligand. Une grande partie des recherches dans le passé a été concentrée sur l'observation de cette liaison par des études structurales sur les états en absence et en présence de ligand. Bien que le premier s'est avéré plus difficile à obtenir, probablement en raison de la nature dynamique de la conformation sans ligand (Haller *et al.*, 2011; Jenkins *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2012; Santner *et al.*, 2012; Serganov *et al.*, 2008; Stoddard *et al.*, 2010; Vicens *et al.*, 2011), beaucoup d'informations ont été amassées. Nous savons aujourd'hui que l'effet de régulation par le riborégulateur est dépendant de la formation de cette tige P1. En bloquant la formation de la tige P1 par mutation, on perd l'effet de régulation ligand-dépendant (Blouin *et al.*, 2011). La stabilisation de la tige P1 est l'évènement qui transmet le signal de liaison à la plateforme d'expression qui, par une multitude de mécanismes différents, contrôle l'expression du gène en aval. Bien que la plupart des mécanismes de régulation retrouvés chez les riborégulateurs soient transcriptionnels ou traductionnels, d'autres modes de régulation utilisés par les riborégulateurs ont été répertoriés dans divers laboratoires (Bocobza et Aharoni, 2014; Caron *et al.*, 2012; Cheah *et al.*, 2007; Gallo *et al.*, 2008; Gusarov et Nudler, 1999; Wachter *et al.*, 2007; Yarnell et Roberts, 1999).

#### 1.2.4.1. Riborégulateurs transcriptionnels

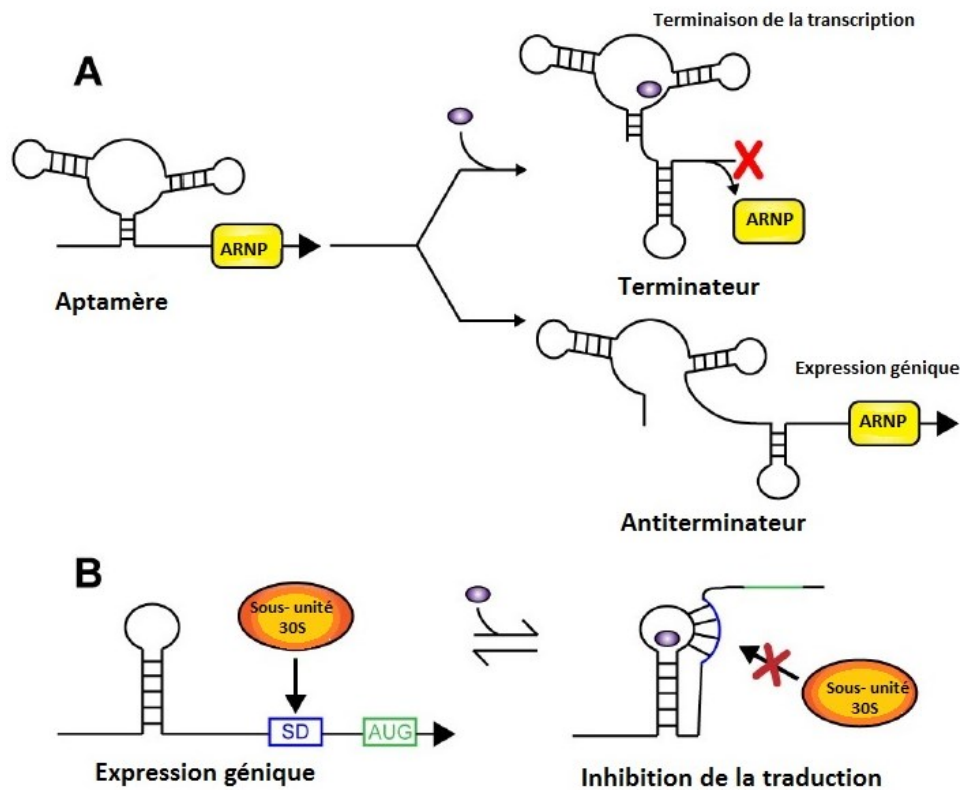
Aujourd'hui, nous savons que l'un des mécanismes les plus couramment utilisés par les riborégulateurs bactériens implique la modulation de la terminaison de la transcription et que ce type de mécanisme est prédominant chez les Firmicutes (*C. difficile*) (Fig. 4A) (Barrick et Breaker, 2007). La formation d'une tige d'ARNdb suivie d'une série de résidus uridines constitue un terminateur de transcription intrinsèque à l'ARNm en transcription (Gusarov et Nudler, 1999; Yarnell et Roberts, 1999), ce qui bloque la transcription par l'ARN polymérase et, éventuellement, la libération de la matrice d'ADN et des produits d'ARN naissants.

Le contrôle de la régulation par les riborégulateurs transcriptionnels se fait cinétiquement en concordance avec la transcription par l'ARN polymérase (Badelt *et al.*, 2015; Gilbert *et al.*, 2006a). Cela se déroule parallèlement dans le temps sur la partie 5' non traduite de la séquence d'ARNm du riborégulateur. En premier lieu, l'ARN polymérase transcrit une première région de l'aptamère d'ARN. Des sites de pause sont présents et permettent le bon repliement de la structure du riborégulateur, assurant ainsi la fonction en augmentant le temps attribué à la liaison (Perdrizet *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2009b). Si le ligand est en concentration suffisante, la formation de la tige P1 transmet le signal de liaison et une tige de terminaison stable est alors formée dans la plateforme d'expression du riborégulateur (Fig. 5A). Ainsi, l'ARN polymérase se dissocie, provoquant une transcription avortée (Barrick et Breaker, 2007). Cependant, si le ligand ne se lie pas à l'aptamère, cela provoque un appariement de bases alternatif dans lequel une hélice d'anti-terminaison est formée, et l'ARN polymérase transcrit le gène en aval. L'exemple décrit représente les riborégulateurs dits «OFF» qui favorisent la répression de l'expression des gènes en présence de ligand. Le contraire est aussi observé pour les riborégulateurs «ON» qui lors de la liaison du ligand vont favoriser l'expression du gène en aval.



#### 1.2.4.2 Riborégulateurs traductionnels

Les riborégulateurs traductionnels agissent au niveau de la traduction et impliquent généralement une activité de transcription normale. Dans ce cas, le même principe de régulation s'applique, mais c'est l'initiation de la traduction qui est inhibée par la séquestration du RBS. Les riborégulateurs traductionnels peuvent aussi réguler l'expression de gènes après la transcription du riborégulateur et de la séquence d'ARNm. On parle alors de régulation thermodynamique, puisque l'évènement de liaison est réversible. Si le ligand est lié par le domaine de l'aptamère, le RBS ou le site Shine-Dalgarno est obstrué, ce qui entraîne l'inhibition de l'initiation de la traduction. En se liant au domaine de l'aptamère, la présence du ligand engendre un changement de conformation de la structure de la plateforme d'expression, qui séquestre le site de RBS (Fig. 5B) (Winkler *et al.*, 2002a). Lorsque la concentration cellulaire du ligand baisse, la quantité de ligands libre diminue, ce qui entraîne la formation d'un appariement de bases alternatif où la formation d'un anti-anti-RBS permet au RBS d'être lié par les ribosomes. Cela a pour effet d'initier la traduction du gène (Caron *et al.*, 2012; Serganov et Nudler, 2013).



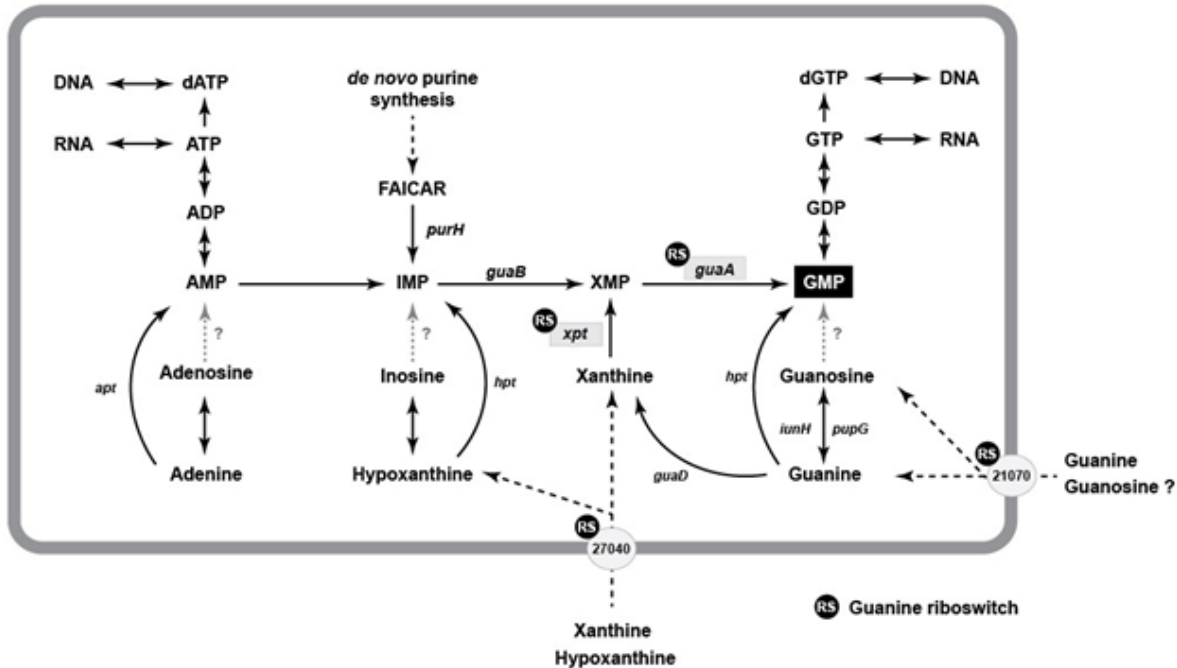
**Figure 5 : (adapté de Nudler *et al* 2004). Mécanismes de régulation des riborégulateurs transcriptionnels et traductionnels.** A) Régulation de la transcription de l'ARNm par le riborégulateur. L'ARN polymérase transcrit une partie de l'aptamère dans un premier temps. Ensuite, en présence ou non du ligand (mauve) il y aura terminaison ou non de la transcription par la formation d'une tige terminatrice (termineur) ou antiterminatrice. B) Régulation de l'initiation de la traduction par le riborégulateur. L'ARNm complet est transcrit et le riborégulateur contrôle l'initiation de la traduction dépendant de la disponibilité du ligand (mauve). La réaction est réversible. En présence du ligand, le riborégulateur adopte une conformation séquestrant le RBS ou Shine-Dalgarno (SD). Par contre, l'initiation de la traduction et expression génique sont permises en absence du ligand.

### 1.2.5. Gènes, voies de biosynthèse et riborégulateurs

Il est clair aujourd'hui que le concept selon lequel les voies de biosynthèse sont régulées par l'inhibition du produit final est bien connu: une inhibition de la première enzyme de la voie métabolique par les produits de cette même voie (Fox et Kelley, 1972). Une des raisons pour lesquelles cette régulation par un des produits de la biosynthèse a lieu est pour assurer une homéostasie de la concentration d'un ou de plusieurs produits afin d'éviter une perte d'énergie due à une surproduction d'un produit de gène en quantité suffisante. Pareillement, une production trop importante d'un produit de gène pourrait se révéler toxique, causant une déplétion d'une autre voie du métabolisme empruntant les mêmes substrats (Mulhbacher *et al.*, 2010). À travers les années, les organismes vivants ont développé des éléments de régulation afin d'assurer cette homéostasie et de toujours conserver une concentration cellulaire suffisante du produit final (protéine), de précurseurs ou d'enzymes de biosynthèse, tout en assurant de ne pas tomber en carence de ce produit. Cela est d'autant plus vrai avec les procaryotes puisqu'ils sont en contact direct avec leur environnement. Ils doivent être prêts à faire des changements rapides d'expression de leurs gènes afin de survivre dans les conditions rapidement changeantes de leurs milieux (Condon, 2007). Chez les bactéries, la rapidité avec laquelle une voie de synthèse peut être activée ou réprimée pourrait jouer un grand rôle dans la survie. Il y a donc plusieurs éléments de régulation qui se retrouvent dans chaque voie métabolique. Cela est aussi le cas pour la biosynthèse des purines chez les microorganismes (Chander *et al.*, 2005; Nygaard et Saxild, 2005; West, 2004). Un des éléments de régulation utilisés dans cette voie de biosynthèse chez *C. difficile* est le riborégulateur guanine (Tableau 1).

### 1.3 Les riborégulateurs guanine de *Clostridium difficile* 630

Le riborégulateur guanine fait partie de la classe des riborégulateurs de purine. Les riborégulateurs de purine détectent une famille de composés constitués de guanine, adénine, 2'-déoxyguanosine, cyclique-di-GMP, et PreQ1 (Batey, 2012). Les représentants de chaque groupe possèdent des structures conservées ayant des interactions avec le composé purine de chaque ligand (Batey, 2012). Les riborégulateurs guanine et adénine sont bien étudiés depuis leur découverte et la détermination de leur structure par cristallographie a été faite il y a environ 10 ans (Serganov *et al.*, 2004; Batey *et al.*, 2004). Il y a quatre représentants de la classe des riborégulateurs guanine chez *C. difficile* et tous sont prédits par bioinformatique comme étant des riborégulateurs transcriptionnels (séquence de U avant les tiges terminatrices par Mfold (*molecule fold*)). Ces riborégulateurs contrôlent la transcription de gènes par l'intermédiaire de la liaison à la guanine, et possiblement de ses analogues naturels soit l'hypoxanthine ou la xanthine (Batey *et al.*, 2004). Il existe d'autres molécules analogues à la guanine qui pourraient aussi lier le riborégulateur. Ce mécanisme de régulation par les riborégulateurs guanine est associé au métabolisme des purines dans plusieurs espèces bactériennes, car il régule la plupart des opérons dans la voie de biosynthèse des purines (Mulhbachter *et al.*, 2010; Winkler, 2005). Dans le cas de *C. difficile* 630, les riborégulateurs guanine régulent quatre gènes notamment impliqués dans la voie de biosynthèse de la guanosine monophosphate (GMP) (Fig. 6). Les produits de ces gènes incluent deux transporteurs de précurseur appelés 21070 codant pour une perméase uracile/xanthine (position 2436110 antisens) et 27040 une perméase putative (position 3125446 sens), ainsi que deux enzymes impliqués directement dans la voie de biosynthèse nommées *xpt* une xanthine phosphoribosyltransférase (XPRTase) (position 2694684 antisens) et *guaA* une guanosine monophosphate synthase (position 257962 sens) (selon NCBI; *National Center of Biotechnology Information*) (voir Tableau 1).



**Figure 6 : (Modifié de Mulhbachter *et al.*, 2010). Métabolisme simplifié du GMP chez *C. difficile* et relation avec les riborégulateurs guanine.** Les flèches pleines indiquent la direction d'un produit à l'intérieur de la voie de biosynthèse et les enzymes impliquées. Les traits pointillés dictent les conversions de substrats indiqués (seuls les gènes pertinents sont indiqués). Les lignes grises pointillées annexées à un point d'interrogation indiquent les réactions pour lesquelles un produit de gène correspondant n'a pas été trouvé chez *C. difficile* (à partir de la base de données Kegg). Les quatre gènes qui sont contrôlés par un riborégulateur guanine (*guaA*, *xpt*, 21070 et 27040) sont présentés dans des boîtes et ovales grises. Voir le texte pour plus de détails sur ces gènes.

### 1.3.1. Contrôle de l'expression génique par les riborégulateurs guanine de *C. difficile*

630

Les riborégulateurs guanine de *C. difficile* sont des riborégulateurs transcriptionnels et lient la guanine avec une haute affinité ainsi que des analogues avec moins d'affinité. Les  $K_d$  (constante de dissociation) retrouvés lors de cartographies chimiques de la guanine pour l'aptamère du riborégulateur guanine *xpt* chez *B. subtilis* sont dans le bas nanomolaire (5 nM) (Regulski et Breaker, 2008). Aussi, des essais RT-qPCR démontrent une baisse d'expression ligand dépendant du gène régulé chez *B. subtilis* (Mulhbacher et Lafontaine, 2007; Mulhbacher *et al.*, 2010). Encore une fois, lors d'essais de bêta-galactosidase effectués chez *B. subtilis*, une baisse de l'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase est observée de façon ligand-dépendante (Mandal *et al.* 2003; Mulhbacher *et al.*, 2010). Plus près de notre organisme à l'étude, des essais de transcriptomique (*RNAseq*) effectués chez *C. difficile* 630 démontrent une baisse en RPKM (*reads per KiloBase per million mapped reads*) des ARNs correspondant aux gènes *guaA*, *xpt* et 27040 par rapport à leur 5' UTR (région du riborégulateur) (Soutourina *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent que les riborégulateurs guanine de *C. difficile* 630 exercent une régulation sur l'expression génique et contrôlent l'expression de leur gène en aval.

On a rapporté que des différences dans la composition en nucléotides des aptamères et des plateformes d'expression pourraient jouer un rôle dans l'efficacité de régulation, voire même la spécificité d'un aptamère pour son ligand ou analogue (Stoddard *et al.*, 2013). Un fait intéressant est la différence entre les séquences des quatre riborégulateurs chez *C. difficile* 630. En effet, bien que les quatre aptamères aient des séquences avec des nucléotides conservés, il existe quelques différences au niveau des régions non conservées. De plus, les plateformes d'expression sont elles aussi complètement différentes en séquence. Ces différences pourraient être indicatrices de variance dans les mécanismes de régulation des

riborégulateurs guanine chez *C. difficile* 630 et pourraient avoir un impact sur l'efficacité de régulation, la spécificité du riborégulateur et même l'affinité pour un ligand.

### **1.3.2. Implication des riborégulateurs dans la voie de biosynthèse du GMP chez *C. difficile* 630**

En raison des rôles essentiels des purines dans la physiologie cellulaire, le niveau de nucléotides puriques intracellulaire doit être maintenu sous contrôle strict. La voie de biosynthèse des purines est étroitement régulée par la répression de la transcription et par des mécanismes d'inhibition (Kim *et al.* 2008; Mandal *et al.* 2003). Un des éléments de régulation génique se fait par les riborégulateurs guanine, qui contrôlent l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de la biosynthèse des purines. Le contrôle de cette voie de synthèse est très complexe. Les travaux sur le riborégulateur guanine (Mandal *et al.* 2003; Mulhbachter *et al.*, 2010; Kim *et al.* 2008; Winkler 2005; Regulski *et al.* 2008), le riborégulateur SAM-I (Montange *et al.*, 2010), TPP (Haller *et al.*, 2013; Winkler *et al.*, 2002b) et c-di-GMP (Bordeleau *et al.*, 2015; Furukawa *et al.*, 2012; Lemay *et al.*, 2011) ont clairement démontré qu'une seule catégorie de riborégulateurs peut avoir un large éventail d'affinité pour un ligand. Par exemple, *B. subtilis* contient au moins 11 riborégulateurs SAM-I et leur affinité pour la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) est généralement corrélée avec le rôle des gènes régulés dans l'importation ou la biosynthèse, permettant à *B. subtilis* d'utiliser préférentiellement un approvisionnement exogène, lorsque disponible (Winkler *et al.*, 2003).

Aux différences possibles d'affinité, spécificité et de fonction des riborégulateurs *guaA*, *xpt* 21070 et 27040 chez *C. difficile*, s'ajoute l'importance de chacun des gènes respectifs aux divers riborégulateurs et leur rôle propre dans la voie de biosynthèse du GMP.

### 1.3.3 Implication des gènes sous contrôle des riborégulateurs guanine

Peu d'études ont été menées sur les riborégulateurs de *C. difficile* et l'information sur les gènes régulés par ces derniers est restreinte. Il en est de même des riborégulateurs guanine de *C. difficile*. De plus, selon NCBI, les deux gènes codant pour des transporteurs, soit 21070 et 27040, sont définis uniquement par homologie de séquence. Ces protéines contiennent généralement 12 régions transmembranaires. De nombreux membres de cette famille sont non caractérisés et peuvent transporter différents substrats. C'est le cas de la xanthine perméase (PbuX) (Christiansen *et al.*, 1997). Elle joue un rôle dans le transport de la xanthine cellulaire, agit aussi comme une perméase d'acide urique qui favorise l'absorption de l'acide urique dans la cellule dans des conditions de limitation d'azote (Schultz *et al.*, 2001), agit comme un uracile perméase (Ghim et Neuhard, 1994) et est un transporteur sodium-dépendant de la vitamine C (NC\_013209.1 selon NCBI). Par contre, aucune étude n'a été menée avec des souches possédant des mutants de délétion de ces gènes. Xpt, une xanthine phosphoribosyltransférase de 18000 Daltons, possède un domaine phosphoribosyltransférase apparenté à d'autres enzymes comme l'adénine phosphoribosyltransférase (EC:2.4.2.7), l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (EC:2.4.2.8), le ribose-phosphatepyrophosphokinase (EC:2.7.6.1), l'amidophosphoribosyltransférase (EC:2.4.2.14), et l'orotate phosphoribosyltransférase (EC:2.4.2.10) (base de données NCBI). Il est prédit non essentiel pour la croissance et l'infection chez les pneumocoques puisqu'une souche possédant un gène *xpt* tronqué (non-fonctionnel) fût isolé d'un patient Écossais (Diggle et Clarke, 2005). GuaA, une GMP synthétase est une amidotransférase de glutamine de la voie de biosynthèse *de novo* des purines. Il y a quelques résultats qui indiquent que le gène *guaA* serait important pour l'infection intramammaire par *S. aureus* dans un modèle bovin (Mulhbacher *et al.*, 2010; Ster *et al.*, 2013) et lors d'infection dans un modèle murin (Mulhbacher *et al.*, 2010). Fait intéressant, le même groupe a procédé à des antibiogrammes en utilisant une molécule analogue à la guanine (PC1). Cette molécule cible le riborégulateur



contrôlant le gène *guaA*. Les résultats ont démontré un effet d'inhibition de croissance sur *S. aureus*. La même expérience fut pratiquée sur *C. difficile*, laquelle a également démontré une inhibition de croissance par PC1, indiquant l'importance du gène *guaA* pour sa croissance. Le gène *guaA* serait aussi important lors d'infections urinaires par *E. coli* (Russo *et al.*, 1996), lors d'infections à *Streptococcus suis* (Wilson *et al.*, 2007), et *Salmonella thyphimurium* (McFarland et Stocker, 1987) indiquant que le gène *guaA* pourrait se démarquer en importance versus les autres gènes régulés par les riborégulateurs guanine chez *C. difficile*.

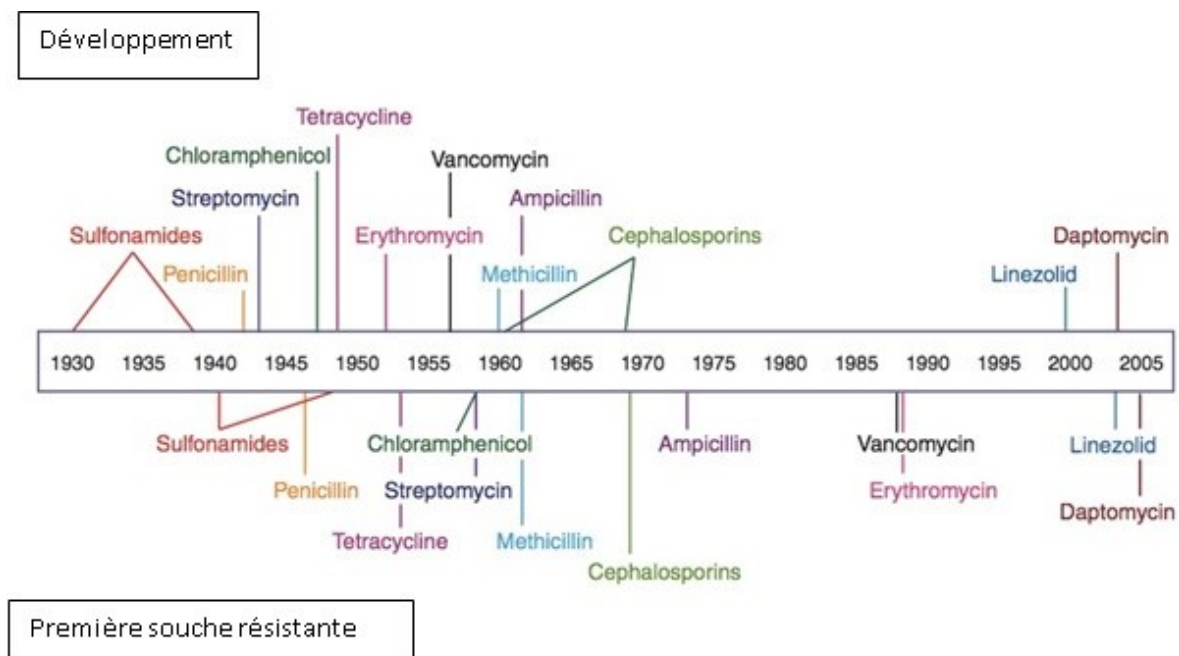
#### **1.4. Importance de la recherche contribuant à la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques**

Tous les organismes vivants évoluent au fil du temps, s'adaptant aux pressions environnementales auxquelles ils sont confrontés. Ainsi, la pression de sélection exercée par la prise de masses d'antibiotiques depuis quelques décennies a favorisé l'évolution de bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Aujourd'hui, nous voyons apparaître des bactéries résistantes contre des antibiotiques de dernier recours (Douris *et al.*, 2008; Gousia *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2004; Kallen *et al.*, 2010; Lesho *et al.*, 2014; Sievert *et al.*, 2013). En effet, des souches d'*Enterococcus* résistantes à la vancomycine (VRE), un antibiotique utilisé en dernière phase de traitement contre certaines infections, ont été isolées de patients aux États-Unis (Biswas *et al.*, 2014; Gousia *et al.*, 2015). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a récemment annoncé l'avènement de l'ère post-antibiotique, signifiant par-là que nous entrons dans une période précaire où des souches bactériennes possédant des résistances aux antibiotiques vont augmenter significativement. Cette affirmation découle du fait que la dernière conception de molécules thérapeutiques atteignant une nouvelle cible bactérienne remonte aux années 1980 (Silver, 2011). Il est donc important que des recherches

soient effectuées afin d'en apprendre davantage sur le potentiel encore vaste d'autres cibles thérapeutiques chez les procaryotes.

#### **1.4.1. Résistance bactérienne**

La résistance aux antibiotiques apparaît comme un phénomène naturel, dû à l'évolution des microorganismes. Cependant, elle est favorisée par l'usage des antibiotiques qui exercent une pression sélective en privilégiant la croissance de souches résistantes ou encore en induisant l'expression de phénotypes inductibles (Moghnieh *et al.*, 2015). De nombreux efforts sont déployés en recherche à travers le monde dans le domaine de la conception de nouveaux antibiotiques. Par contre, puisqu'elles découlent habituellement de modifications d'un antibiotique existant, les souches développent des résistances après quelques générations seulement. Le développement de nouvelles molécules thérapeutiques devient alors nécessaire. En effet, à la sortie d'un antibiotique sur le marché, cela ne prend que quelques années avant que n'apparaisse une souche qui y soit résistante (Chen *et al.*, 2009; Cormier *et al.*, 2012; Drawz et Bonomo, 2010; Huang *et al.*, 2009a) (Fig. 7). Cette acquisition rapide de résistance peut s'expliquer par l'utilisation continue des mêmes cibles d'antibiotiques chez la bactérie. Lorsque les antibiotiques se voient inactivés par des mécanismes de résistance bactériens, ils sont simplement réutilisés à l'aide d'une modification chimique supplémentaire sur la molécule thérapeutique, facilitant la contremodification du mécanisme de résistance chez les procaryotes (Jabes, 2011; Phelan *et al.*, 2012; Worthington et Melander, 2013).



**Figure 7 : (adaptée de Clatworthy *et al.*, 2007). Antibiotiques : conception et résistance.** Schéma linéaire de temps démontrant la date de conception ou de développement d'un antibiotique (partie supérieure) et l'année de la découverte de souche résistante à un antibiotique (partie inférieure).

### 1.5. Objectifs du projet de maîtrise

Chaque riborégulateur guanine chez *C. difficile* 630 possède une plateforme d'expression différente au niveau de la séquence et de la structure ainsi que quelques différences dans la séquence de leur aptamère. Considérant que chaque gène possède un riborégulateur qui lui est propre, qu'il existe des différences majeures entre chacun de ces riborégulateurs, que la régulation est prédite de ce fait de façon transcriptionnelle donc cinétiquement (laps de temps décisionnel plus court) et que la position dans la voie métabolique dans laquelle ces gènes

régulés sont impliqués varie en importance, il devient alors très intéressant de clarifier cette relation. De plus, dans un contexte d'application des connaissances, une méthode d'analyse peut être développée afin de discriminer les riborégulateurs les plus intéressants pour la conception de molécules thérapeutiques. Puisque les riborégulateurs régulent l'expression de gènes de manière ligand-dépendante, une conception de molécules thérapeutiques basée sur la reconnaissance du riborégulateur pour son ligand (ou analogues) est envisageable. En fait, certains composés analogues des ligands naturels de plusieurs classes de riborégulateurs ont démontré une efficacité de régulation de gènes associés (Furukawa *et al.*, 2012; Gilbert *et al.*, 2006b; Matzner et Mayer, 2015; Taylor *et al.*, 2013). De plus, il a aussi été démontré que ces analogues de ligand réduisaient l'expression de gènes importants chez certaines espèces bactériennes (Blount *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Lünse *et al.*, 2014; Matzner et Mayer, 2015; Mulhbachner *et al.*, 2010). Considérant l'importance de ces découvertes chez certaines bactéries, il est clair qu'une identification parallèle de cibles thérapeutiques chez *C. difficile* serait bénéfique. C'est dans cette optique que l'étude des riborégulateurs et de l'impact des gènes régulés sur la biologie de *C. difficile* a été menée.

Un aspect important qui a été pris en considération tout au long de mon projet de maîtrise, en rapport avec la conception de molécules thérapeutiques ciblant les riborégulateurs, est la détermination de l'efficacité de régulation des différents riborégulateurs. C'est en utilisant une méthodologie à trois étapes que les riborégulateurs ont été étudiés afin de sélectionner les cibles potentielles les plus intéressantes. Cette méthodologie vise à : (1) Repérer un riborégulateur chez *C. difficile* 630 ayant un ligand connu avec une possibilité de concevoir facilement un analogue et qui lie de façon spécifique. (2) Déterminer que la régulation du gène en aval par le riborégulateur est efficace. L'étude de leur capacité respective de réguler l'expression du gène se retrouvant en aval ont été analysée par RT-qPCR, cartographie chimique et par essai de gène-rapporteur. (3) Analyser le gène régulé et déterminer l'importance de ce gène pour la voie de biosynthèse dans lequel il est impliqué. Cela fût déterminé en obtenant des mutants d'inactivation par insertion des quatre gènes chez *C.*

*difficile* 630. Cette approche utilisée au cours de mon projet pourrait potentiellement servir de méthodologie pour d'autres espèces bactériennes. Une première étape dans la détermination de cible et dans la conception de molécules thérapeutiques informe aussi sur les subtilités associées aux différences entre chaque riborégulateur d'une même classe au sein de la même souche bactérienne. Aussi, elle nous informe sur les différences en importance des gènes et des riborégulateurs et de l'implication des différents acteurs au sein du métabolisme.

## CHAPITRE 2

### ARTICLE

#### 2.1. Résumé de l'article

L'article présenté ici reflète les résultats et hypothèses associés à mon projet de recherche de maîtrise. Il sera présenté à PNAS (*Proceedings of the National Academy of Science*). Cet article vient souligner l'importance des riborégulateurs guanine pour la biologie de *C. difficile* 630 ainsi que démontrer l'importance du gène *guaA* sous le contrôle d'un riborégulateur. C'est la première fois qu'est démontré l'effet néfaste de la perte d'expression normale du gène *guaA* sur la croissance et le pouvoir infectieux de *C. difficile* 630. Notamment, il est aussi démontré que les quatre riborégulateurs guanine chez *C. difficile* sont exprimés et fonctionnels, d'après les résultats obtenus avec les techniques utilisées lors des analyses expérimentales. Les résultats de David Lalonde Séguin pour les figures d'essais de croissance sur pétris du mutant d'inactivation par insertion des quatre gènes ainsi que les contrôles expérimentaux ont contribué à l'avancement des connaissances sur *C. difficile* dans le cadre de ce projet. Ces résultats viennent appuyer l'hypothèse que les riborégulateurs pourraient être efficaces en tant que cible pour la conception de molécules thérapeutiques afin de contrer les infections par *C. difficile* (ICD).

#### 2.2 Manuscrit

**Inactivation of the riboswitch-controlled GMP synthase *GuaA* in  
*Clostridium difficile* is associated with severe growth defects and poor  
infectivity in a mouse model of infection**

---

Erich Smith-Peter<sup>1,2</sup>, David Lalonde Séguin<sup>1</sup>, Daniel Lafontaine<sup>2</sup>, and Louis-Charles Fortier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de microbiologie et d'infectiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Québec, Canada

<sup>2</sup>Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Québec, Canada

Running title: *GuaA* is important for *C. difficile* survival and infectivity

**Corresponding authors:**

Louis-Charles Fortier

Daniel Lafontaine

Keywords: *Clostridium difficile*, riboswitch, GMP synthase, *guaA*, guanine

## Abstract

*Clostridium difficile* is the main cause of nosocomial antibiotic-associated diarrhea. There is an urgent need to identify new antimicrobial targets to tackle this pathogen. Guanine riboswitches have been proposed as promising new targets, but experimental evidence of their importance in *C. difficile* is missing. The genome of *C. difficile* encodes 4 predicted distinct guanine riboswitches, each controlling a single gene involved in purine metabolism and transport. One of them controls the expression of *guaA*, encoding a guanosine monophosphate (GMP) synthase. Using in-line probing, RT-qPCR and GusA reporter assays, we show that these riboswitches are functional in *C. difficile*, and cause premature transcription termination upon binding of guanine. The affinity for guanine is high with  $K_d$  values in the low nanomolar range, and xanthine and guanosine also bind the guanine riboswitches, although with less affinity. We show that inactivating the GMP synthase (*guaA*) in *C. difficile* strain 630 leads to cell death in poor growth conditions, but not in rich medium. Furthermore, the capacity of a *guaA* mutant to colonize the gut and compete with a wild type *C. difficile* strain was significantly reduced in mice. Together, these results demonstrate for the first time the importance of *de novo* GMP biosynthesis in *C. difficile* during infection. Our data further validate the strategy of targeting guanine riboswitches with non-metabolizable analogs to block *guaA* expression, since *de novo* GMP biosynthesis is crucial for *C. difficile* growth and competitiveness within the gut environment.

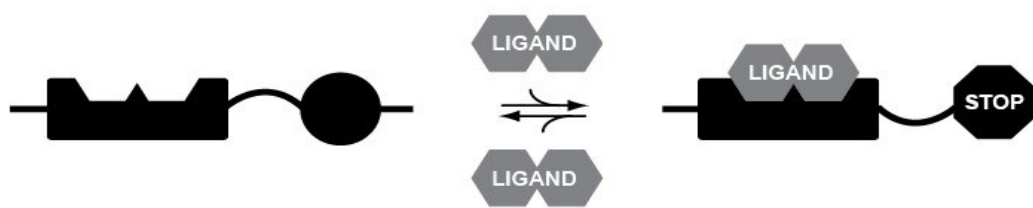
## Introduction

*Clostridium difficile* is a Gram-positive pathogen causing intestinal infections in humans and animals (1). It is currently the most important cause of healthcare-associated post-antibiotic infections, but it also causes an increasing number of community-acquired infections (2). The



current therapeutic options consist in oral administration of metronidazole, vancomycin or fidaxomicin (3). Despite a relatively good efficacy of these antibiotics against *C. difficile*, recurrent infections are becoming increasingly problematic (4). Non-conventional approaches such as fecal microbiota transplantation have shown great promises to treat recurrent infections, but they have their own limitations and further research is needed (5). Thus, it is of utmost importance to develop new drugs to fight this important pathogen.

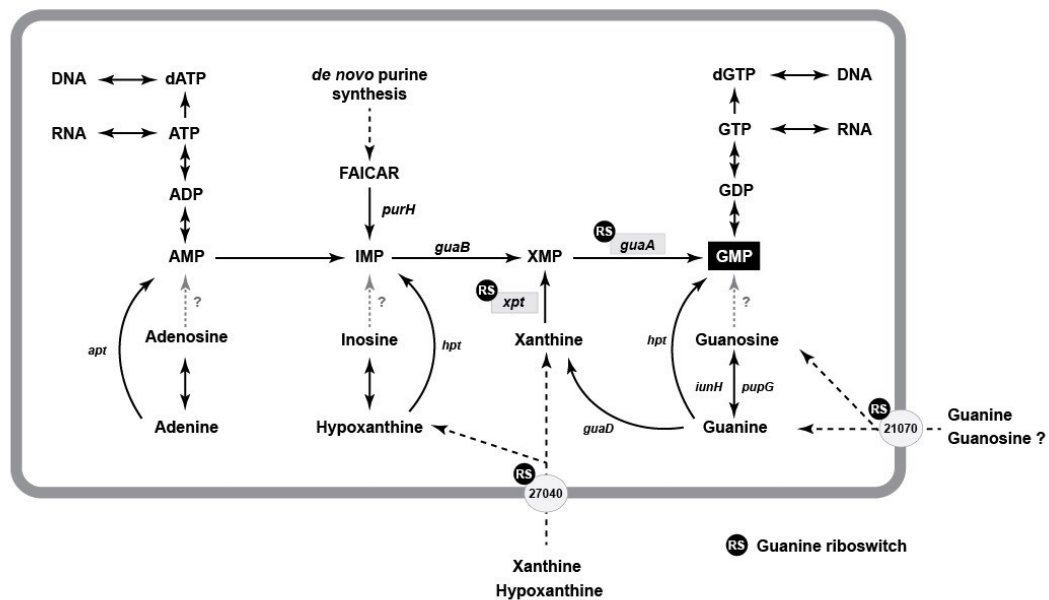
Riboswitches have recently made their entry as potential new targets to fight multidrug resistant bacteria (6, 7). Riboswitches are *cis*-acting RNA elements found in the 5' untranslated region (5'-UTR) of a number of bacterial genes, as well as a few eukaryotes (8). They often control the expression of genes involved in the biosynthesis of important metabolites such as vitamins and cofactors, and new classes are constantly identified (9, 10). Riboswitches are typically composed of two functional domains: the aptamer, which selectively binds with high affinity (in the low nanomolar range) a target metabolite, and the expression platform that responds to metabolite binding and controls the expression of the associated gene present on the same messenger RNA (11) (Fig. 8). Upon binding of the ligand, a change of conformation in the expression platform leads to a change in the expression of the downstream gene. Most known riboswitches are either transcriptional or translational switches, meaning that they either affect transcription or translation of the gene, but the type of regulation can be more complex (12). They can also promote (ON switches) or repress (OFF switches) the gene expression.



**Figure 8. Schematic representation of the structure of a riboswitch.** Shown here is the On and OFF states of a riboswitch from *Clostridium difficile* 630.

The simplest riboswitch known to date is the guanine riboswitch. It has been well described in the model organism *Bacillus subtilis*, where it controls the expression of 4 transcriptional units, including single genes *yxjA* and *pbuG*, or small operons *xpt-pbuX* or large gene clusters like the *pur* operon encoding 12 genes (9). Guanine riboswitches are transcriptional OFF switches and they have been shown to repress the expression of their cognate gene upon binding of guanine. *In vitro* binding assays with the *B. subtilis* *xpt-pbuX* riboswitch showed a binding affinity (dissociation constant,  $K_d$ ) for guanine of  $\sim 5$  nM and a preference of  $\sim 10$ -fold for guanine over other purine analogs such as xanthine and hypoxanthine (9, 11). Guanine riboswitches are associated with genes involved in the metabolism and transport of purines. The metabolism of nucleotides is quite complex and involves *de novo* biosynthesis as well as salvation pathways (13, 14). Guanosine monophosphate (GMP) is an important cellular metabolite for energy and signaling (e.g. cyclic di-GMP), and that enters into the composition of ribonucleic acids. GMP can be generated directly from guanine and guanosine, following simple enzymatic reactions (Fig. 9). In the absence of guanine or guanosine in the growth environment, bacteria can use adenine and other purine analogs such

as xanthine and hypoxanthine for direct conversion into inosine monophosphate (IMP) that can be further converted into xanthine monophosphate (XMP), and ultimately GMP through the action of the GMP synthase (GuaA). If these purine precursors are unavailable, bacteria can use nucleotide salvation pathways, or proceed to *de novo* biosynthesis of IMP through a multistep pathway involving genes from the *pur* operon (13-16) (Fig. 9).



**Figure 9. Simplified metabolic view of the metabolism of purines and GMP biosynthesis in *C. difficile*.** Solid arrows indicate that *C. difficile* encodes the enzymes necessary to perform the indicated substrate conversions (only the relevant genes are indicated). Dotted grey lines indicate reactions for which a corresponding gene product was not found in *C. difficile* (based on the Kegg database). The 4 genes that are controlled by a guanine riboswitch (*guaA*, *xpt*, 21070 and 27040) are shown in grey boxes. See the text for details on these genes.

Despite the presence of several genes predicted to participate in purine metabolism and *de novo* GMP biosynthesis in the pathogenic bacterium *C. difficile*, little is known about these pathways and their regulation. In a previous study, we identified 4 guanine riboswitches in the genome of strain 630 (17). Of note, each of the 4 riboswitch is predicted to control the expression of a single gene. *CD630\_21070* and *CD630\_27040* encode proteins with conserved domains found in PbuG-like purine transporters (IPR026033, COG2252, pfam00860). The exact nature of the substrate(s) transported by these permeases is unknown since, but based on bioinformatics predictions, possible substrates could be guanine, hypoxanthine, xanthine, uracil, thiamine and/or ascorbate. *CD630\_23300* encodes a predicted xanthine phosphoribosyl transferase (Xpt) and *CD630\_01980* encodes a predicted GMP synthase (GuaA). The products of these genes would catalyze the conversion of xanthine into XMP, and XMP into GMP, respectively (Fig. 9).

GMP is an important metabolite for bacterial survival and virulence (17-20). Inactivation of *guaA* generally leads to guanine auxotrophy (21, 22) and therefore, *guaA* is crucial for *de novo* biosynthesis of GMP. In *S. aureus*, *guaA* is the last gene of an operon comprising *xpt*, encoding a xanthine phosphoribosyl transferase, *pbuX*, encoding a purine permease, and *guaB*, encoding an inosine monophosphate (IMP) dehydrogenase. Of interest, this operon is under the control of a single guanine riboswitch. Binding of guanine analogs to the riboswitch leads to premature transcription termination and repression of the expression of the whole operon. The net result is auxotrophy for guanine/GMP (17).

Current data suggest that GuaA is also important for *C. difficile* survival since guanine analogs targeting the guanine riboswitch located upstream of the *guaA* gene leads to growth inhibition (17). However, direct experimental evidence for the importance of GuaA and GMP metabolism were missing, in particular in the context of an infection. This was the objective of our study. Here we show that inactivation of *guaA* leads to guanine/GMP auxotrophy and

affects bacterial growth and survival *in vitro*. We also show that a *guaA* mutant is less virulent and competitive in a mouse model of *C. difficile* infection. Furthermore, we demonstrate the functionality of 4 guanine riboswitches located upstream of *guaA* and three other genes associated with purine transport and metabolism. Our study further supports the potential of guanine riboswitches as therapeutic targets for the treatment of *C. difficile* infections.

## **Materials and methods**

### **Bacterial strains and growth conditions**

*C. difficile* strain 630 $\Delta$ *erm* and the *Escherichia coli* CA434 donor strain used for conjugation were kind gifts from Nigel Minton (Nottingham, UK). *C. difficile* was grown under anaerobic atmosphere (10% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 85% N<sub>2</sub>) at 37°C using a Coy Laboratory anaerobic chamber (Coy Laboratory). *C. difficile* was routinely grown in brain heart infusion (BHI) (BD Biosciences), BHIS (BHI supplemented with 2% yeast extract and 1% L-cysteine) or in TY broth (3% tryptose, 2% yeast extract, pH 7.4). For agar plates, 1.5% agar was added to the above media. Mueller Hinton broth (cation-adjusted) (MHBCA; BD Biosciences) and a minimal defined medium (MDM) were also used in specific experiments (24). *E. coli* CA434 was routinely grown in Luria-Bertani (LB) broth or agar (BioShop). When needed, antibiotics were added to media at the following concentrations: Kanamycin 100 µg/mL, norfloxacin 12 µg/mL, thiamphenicol 15 µg/mL, or erythromycin 2.5 µg/mL. A list of the strains and plasmids used in this study can be found in Supplementary Table 1.

## Gene inactivation and complementation in *C. difficile*

The *guaA*, *xpt*, *CD630\_21070* and *CD630\_27040* genes were inactivated in *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* using the ClosTron technology (23). ClosTron constructs were ordered through the DNA 2.0 Company (CA, USA) and transferred by conjugation into *C. difficile* as described elsewhere (31). Selection of integrants was done with erythromycin and confirmation of the interruption of the target gene was done by PCR with primers flanking the integration site (Supplementary Table 2). For complementation assays, the *guaA* gene was cloned into the *SacI* and *BamHI* sites of the shuttle plasmid pRPF144 (26) in place of the *gusA* reporter gene, leading to creation of pSMI5 (*guaA*), and then transferred by conjugation from *E. coli* CA434 into the appropriate *C. difficile* mutant strain.

## Growth curve experiments

A 5-mL tube of BHI broth was inoculated from an isolated colony grown on BHI agar and incubated O/N at 37°C anaerobically. The next morning, another 5-mL tube of fresh BHI was inoculated at 2% with the pre-culture and bacteria were grown until the optical density at 600nm (OD<sub>600</sub>) reached ~0.5. Then, bacteria were centrifuged, washed in 5 mL of pre-reduced PBS and centrifuged again. Bacteria were then inoculated at an initial density of ~10<sup>7</sup> CFU/mL in the indicated broth and incubated at 37°C anaerobically. Samples were collected at various time points, and serial dilutions were plated on MHBCA plates. Colonies were counted after overnight incubation to determine the number of CFU/mL.

## **In-line probing assays**

For the production of guanine riboswitch aptamers for in-line probing assays, DNA templates were prepared from partial duplexes and transcribed using T7 RNA polymerase as previously described (Milligan et al., 1987). The aptamer sequences used in this study were based on the genomic sequence from strain 630 (INSDC Accession No AM180355), to which a GCG sequence was added to the 5' extremity to allow high transcription yield and to minimize the 5' heterogeneity. In-line probing assays were done following standard procedures (25). Briefly, [5'-<sup>32</sup>P]-labeled RNA molecules were incubated for 48 h at 25°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub> and 100 mM KCl in the absence or presence of the indicated ligand concentrations. The reactions were stopped with a 97% formamide solution containing 10 mM EDTA, xylene cyanol and bromophenol blue and samples were separated by electrophoresis in 8% polyacrylamide gels (acrylamide:bisacrylamide; 19:1) containing 8 M urea. Gels were dried and exposed to Phosphor Imager screens.

## **Quantification of gene expression by RT-qPCR**

The *C. difficile* strain 630 was grown overnight in BHI broth and the next morning, a 1% inoculum was prepared in MDM supplemented with threonine (MDM-T) (24) and guanine (25, 100, and 300 mg/L). Cultures were grown for 24 h at 37°C under anaerobic conditions and total RNA was extracted as described before (31). The RNA pellet was solubilized in RNase-free water (Wisent) and the RNA concentration was determined on a Take3 apparatus (BioTek). Aliquots of 10 µg of total RNA were treated with RNase-free Turbo DNase (Ambion) and the absence of DNA contamination was verified by real-time quantitative PCR (qPCR) using 200 ng of total RNA and PCR primers targeting the 16S rRNA gene as previously reported (32). RNA integrity was assessed with an Agilent 2100 BioAnalyzer

(Agilent Technologies) through the RNomic platform of the Université de Sherbrooke (LGFUS.ca). cDNA synthesis was performed on 1 µg of RNA from three independent assays with the SuperScript III (Life Technologies) kit according to the manufacturer's instructions. Quantification of *guaA* expression was done by real-time qPCR in 10-µL reactions on a CFX-96 thermocycler (BioRad) through the RNomic platform, following procedures described previously (31). One-way analysis of variance was used to detect significant differences between treatments for each guanine concentration. A threshold of  $p = 0.05$  was used to assess significance.

### **GusA reporter assays**

Transcriptional fusions of the guanine riboswitches and the *gusA* reporter gene were constructed as follows. The pRPF144 plasmid (26) was first modified by introducing a multiple cloning site (MCS) amplified by PCR from the pMTL84153 plasmid (33), using primers LCF837 and LCF838 (Supplementary Table 2). The MCS was then cloned in reverse orientation into the *SacI* site of pRPF144, creating the plasmid pLOS144. This plasmid was then used to clone the different riboswitch aptamers, transcriptionally fused to the *gusA* reporter gene. The aptamer region of each riboswitch was amplified by PCR using primers listed in Supplementary Table 2. The amplicons were then cloned into the *SacI* site of pLOS144, creating plasmids pSMI1, pSMI2, pSMI3 and pSMI4 containing the riboswitch from *guaA*, *xpt*, *27040* and *21070*, respectively (Supplementary Table 1). The GusA activity was measured in MDM supplemented with the indicated metabolites, using a modified version of the procedure described in Mani *et al* (34). Briefly, a pre-culture of *C. difficile* carrying the various plasmids was done in MDM + thiamphenicol 15µg/mL until the OD<sub>600</sub> reached 0.7, at which point cells were centrifuged and washed in reduced PBS, and re-suspended in MDM +/- the metabolites. Cells were incubated for 2 h at 37°C under anaerobic conditions, and 1-mL samples were collected by centrifugation, suspended in Z-buffer,



treated for 1 h at 37°C with an endolysin preparation to destabilize the peptidoglycan cell wall, and lysed by sonication. The determination of the GusA activity was then made by combining 0.1 mL of lysate with 0.1 mL of Z-buffer in a 96-well plate, and by adding 40 µL of a solution of 6 mM p-nitrophenyl-β-D-glucuronide (34). The specific activity was determined by reporting the Miller units in function of the total protein concentration of each sample, as determined by Bradford quantification. One-way analysis of variance was used to detect significant differences between treatments for each aptamer construct. A threshold of  $p = 0.05$  was used to assess significance.

### **Determination of *C. difficile* competitiveness in a mouse model of infection**

All experiments were performed with 6 to 8 weeks old C57BL/6 female mice (15.5 g to 19 g), purchased from Charles River Laboratories. Manipulations were in accordance with the Canadian Council on Animal Care and the protocol was approved by the animal ethic's committee of the faculty of medicine and health sciences of the Université de Sherbrooke. Mice were housed in sterile cages equipped with HEPA filters and sterile bedding, fed with sterile food and water ad libitum. Mice were made susceptible to *C. difficile* infection by the addition of 450 mg/L streptomycin and 250 mg/mL clindamycin in their drinking water for 3 days. Then, a single intraperitoneal dose of clindamycin (1 mg/mouse) was given 24 h before gavage with  $10^5$  spores of wild type *C. difficile* 630Δ*erm* and  $10^5$  spores of the *guaA* mutant strain, in 0.1 mL of water. Spores were prepared as described before (35). Clinical signs of infection were monitored twice a day (diarrhea, hunched back, lethargy) and mice were weighed daily. Fresh fecal samples were collected directly from the animal anus at different time points, and quickly homogenized in reduced PBS under anaerobic conditions. During the acute infection period, some mice had diarrhea and did not produce collectable fecal matters and thus some of the samples could not be analyzed for bacterial counts. *C. difficile* total cell counts were determined by plating serial dilutions of the fecal suspensions on BHI

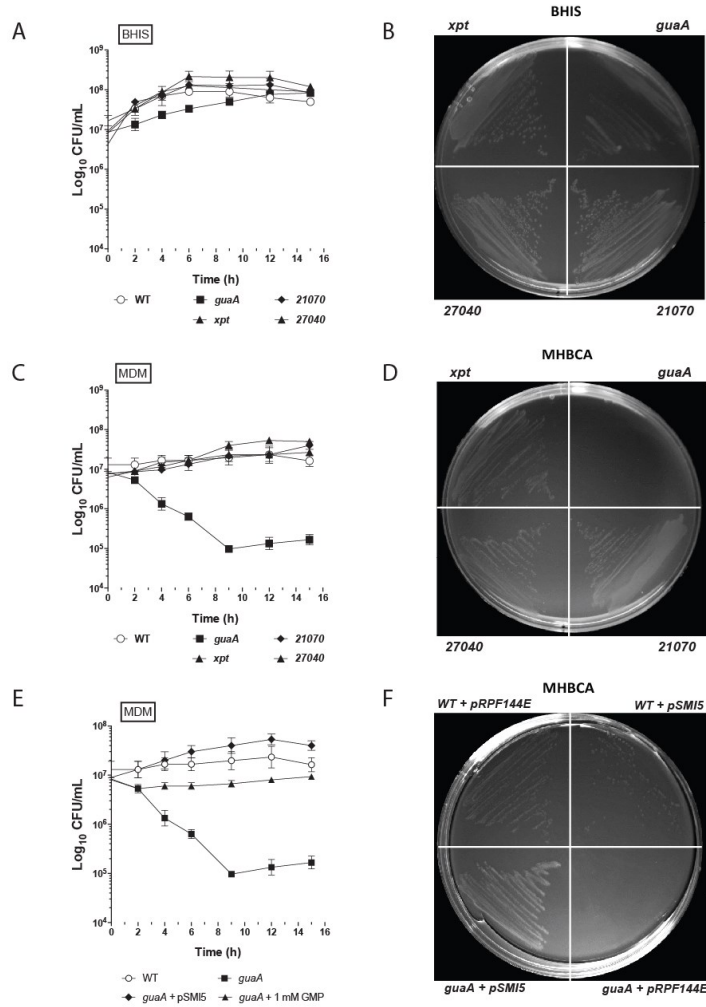
agar plates containing 8 µg/mL cefoxitin + 12 µg/mL norfloxacin to select for *C. difficile* cells, as well as 0.1% taurocholic acid and 1 mM glycine to favor spore germination (BHI-CN-TAG) (35). To count spores, fecal suspensions were treated for 1 h with 50% ethanol and serial dilutions were plated on BHI-CN-TAG plates. To discriminate between wild type and *guaA* mutant cells, erythromycin was added to the agar plates; only the mutant strain grew due to the presence of an erythromycin cassette introduced with the group II intron of the ClosTron. Bacterial counts were determined after overnight incubation at 37°C under anaerobic atmosphere and were reported as colony forming units (CFU) per gram of feces.

## Results

### Inactivation of the GMP synthase in *C. difficile* leads to medium-dependent growth defects

In a previous study, we reported the presence of 4 guanine riboswitches in *C. difficile*, each controlling a gene predicted to be involved in de novo biosynthesis of guanosine monophosphate (GMP) and transport of purine precursors (Fig. 9) (17). However, direct experimental evidence for the importance or essentiality of these genes was lacking. We therefore generated inactivation mutants of these 4 genes in *C. difficile* strain 630 and assessed their importance in cell growth in vitro. To do this, we used the ClosTron gene inactivation system (23) to interrupt the *guaA*, *xpt*, *CD630\_21070*, and *CD630\_27040* genes (hereafter *21070* and *27040*). Inactivation mutants were readily isolated on BHIS agar plates, suggesting that the product of these genes is non-essential in rich medium. However, *C. difficile* should be able to generate GMP directly from guanine or guanosine, which are likely present in a rich medium such as brain heart infusion broth (BHIS). Thus, we assessed growth of the mutants on media that were less rich than BHIS, such as cation-adjusted

Mueller-Hinton broth (MHBCA) and *C. difficile* minimal defined medium (MDM) (24). As shown in Fig. 10A-B, all mutants were able to grow on BHIS agar plates. Growth curve experiments in broth showed that the *guaA* mutant grew a little slower than the WT and the other mutants, but the final bacterial density was similar after 15 h. On MHBCA agar plates, the *guaA* mutant showed impaired growth, and a 2-log reduction in colony forming units (CFU)/mL was observed over the first 8 h of growth in broth (Fig. 10C-D). Likewise, only the *guaA* mutant was affected in MDM broth (Fig. 10E). Complementation of the *guaA* mutant with a plasmid copy of the *guaA* gene restored the growth phenotype in MDM broth (Fig. 10E), as well as on MHBCA agar plates (Fig. 10F), while both the mutant and complemented strains grew well on BHIS agar (Supplementary Fig. 1). These results demonstrate the essentiality of *guaA* in poor growth conditions in which de novo biosynthesis of GMP is required. As a confirmation of the importance of *guaA* for GMP synthesis, we were able to rescue *guaA* mutant cells in MDM by the addition of 1 mM GMP directly to the medium (Fig. 10E). The growth recovery observed with the *guaA* mutant after 8 h was probably caused by the release of cellular metabolites upon cell lysis, thereby enabling *guaA* mutant cells to grow using readily available guanine, guanosine and/or GMP. Taken together, these results suggest that only the product of *guaA* is essential under laboratory conditions. For this reason, we focused most of our study on *guaA* and its cognate riboswitch.

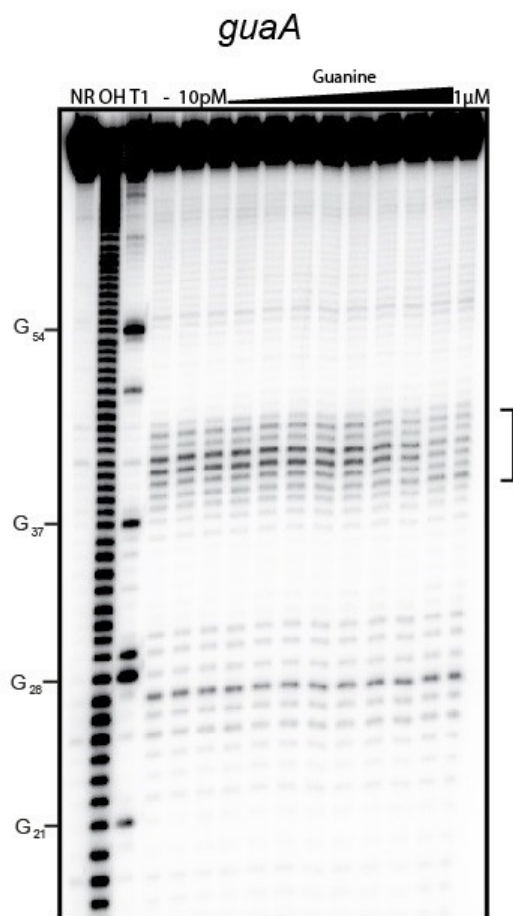


**Figure 10. Growth of wild type (WT) and mutant *C. difficile* strains in different conditions.** The WT strain 630 and the indicated mutants (*guaA*, *xpt*, 21070 or 27040) were grown in BHIS broth (A) or MDM broth (C and E) and bacterial counts are reported in CFU/mL in the corresponding graphs. The strains were also streaked and grown on BHIS agar (B), or MHBCA agar (D and F). In some experiments, the *guaA* mutant was complemented with the pSMI5 plasmid carrying a copy of the *guaA* gene under the control of the constitutive *P<sub>cwp2</sub>* promoter. The empty plasmid pRPF144E was used as a control. The broth cultures were repeated three times and the mean and standard deviation is reported.

## **The expression of *guaA* is controlled by a functional riboswitch with high affinity for guanine**

In silico folding of the guanine riboswitches in *C. difficile* suggests that they all function as transcriptional attenuators upon binding of guanine to the aptamer (Fig. 11A). A multiple sequence alignment with the consensus sequence of the purine riboswitch available in the Rfam database shows that each riboswitch sequence is different, but the predicted secondary structure and the conserved nucleotides are present suggesting that the 4 riboswitches in *C. difficile* are functional (Fig. 11B and C). In addition, the presence of 4 independent guanine riboswitches in *C. difficile* 630 suggests that the expression of the associated genes, i.e. *xpt*, *guaA*, *21070* and *27040*, might be regulated independently depending on the intracellular levels of guanine and/or related metabolites. To determine whether these riboswitches are capable of binding guanine, we performed in-line probing assays with the corresponding aptamer from each riboswitch (25). Protection of specific nucleotide residues interacting with guanine was observed with increasing concentrations of the ligand. This allowed us to confirm their capacity to bind guanine, and also informed us about their affinity for the ligand. Dissociation constants ( $K_d$ ) were all in the low nM range, with  $2.61 \pm 1.29$ ,  $1.78 \pm 0.95$ ,  $3.06 \pm 0.29$ , and  $4.44 \pm 2.75$  nM for *guaA*, *xpt*, *21070*, and *27040*, respectively (Fig. 12 and Supplementary Fig. 2). We also determined the affinity of the riboswitches for xanthine and hypoxanthine, two precursors that lead to the biosynthesis of xanthine monophosphate (XMP), which is a direct substrate of the GMP synthase GuaA (Fig. 9).  $K_d$  values determined by in-line probing assays were an order of magnitude higher than for guanine, with 24.12 nM and 93.95 nM for xanthine and hypoxanthine, respectively. Together, our data show that the 4 riboswitches can bind guanine with high affinity *in vitro* and that they likely contribute to regulation of gene expression.





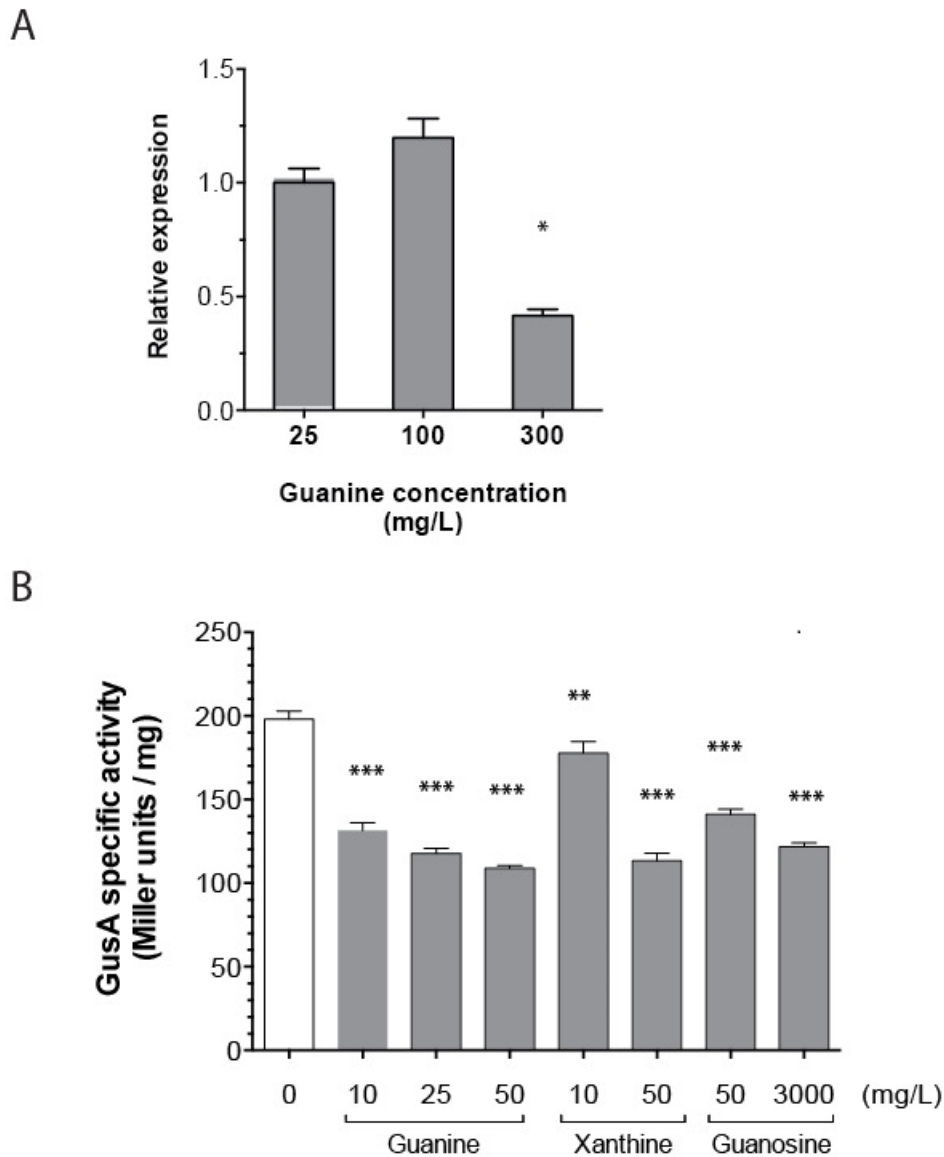
**Figure 12. In-line probing with the *guaA* riboswitch.** In-line probing assays of the *C. difficile* *guaA* riboswitches in the absence (-) or increasing concentrations (10 pM to 1  $\mu$ M) of guanine (G). Sites of substantial ligand-induced protections (positions 49–54) are assigned on the right by a vertical bracket. Lanes NR, L and T1 correspond to molecules that were not reacted or that were partially digested by alkali or by RNase T1, respectively. Guanines are identified on the left as molecular weight markers.

## Guanine and related metabolites trigger riboswitch-mediated differential gene expression in *C. difficile*

GMP is an important cellular metabolite and the GMP synthase encoded by *guaA* is expected to be important for *de novo* GMP biosynthesis (Fig. 9). In-line probing data showed that the riboswitches can bind guanine *in vitro*, and therefore should be functional. We further investigated whether guanine could repress *guaA* expression in its natural context, *i.e.* in *C. difficile* cells grown in the presence or absence of guanine. To do this, cultures of *C. difficile* strain 630 were grown for 24 h in MDM supplemented with threonine (MDM-T) (24) and guanine (25, 100, and 300 mg/L). The relative expression of *guaA* was then analyzed by RT-qPCR after total RNA extraction and cDNA synthesis. A ~2-fold reduction in *guaA* expression was observed in cells incubated with 300 mg/L guanine (Fig. 13A), suggesting that the *guaA* riboswitch is indeed functional in *C. difficile*. We also verified the functionality of the *guaA* riboswitch using a gene reporter assay. Transcriptional fusions were constructed in which the *guaA* riboswitch and the first 10 codons of the *guaA* gene were fused to the *gusA* gene encoding the  $\beta$ -glucuronidase reporter enzyme, under the control of the constitutive promoter  $P_{cwp2}$  (Supplementary Fig. 3)(26). Cells were incubated for 2 h in MDM supplemented with increasing concentrations of either guanine or the analogs xanthine or guanosine, and the GusA activity was determined on whole bacterial lysates. The results show that the reporter activity decreased with increasing concentrations of guanine, with ~50% reduction in GusA activity with 50 mg/L guanine. A similar result was obtained with 50 mg/L xanthine. With guanosine, the inhibition with 50 mg/L was less than with guanine or xanthine, with a ~25% reduction in GusA activity. Note that higher concentrations of guanosine did not further repress the activity, suggesting a saturation of the system. Although guanosine is able to bind the *guaA* riboswitch *in vitro* (data not shown), it is possible that guanosine is converted to guanine within *C. difficile* cells, generating guanine that can bind to the riboswitch (Fig. 9). A control experiment, in which the *gusA* gene was placed under the control of the  $P_{cwp2}$  promoter, in the absence of the intervening riboswitch,



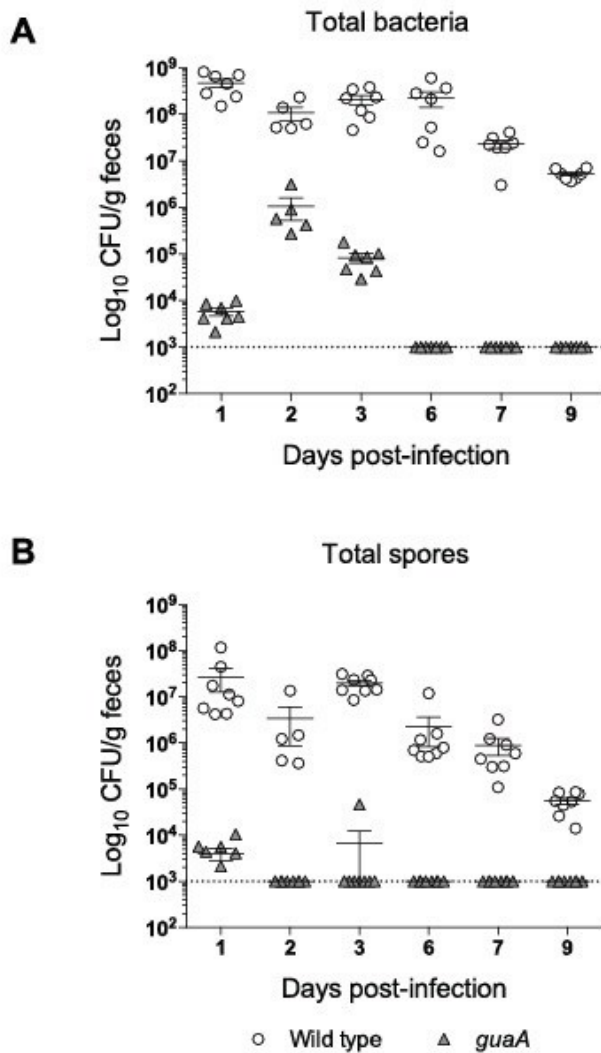
did not show any difference in gene regulation in the presence of guanine, suggesting that the reduction in GusA activity was directly due to an effect on the riboswitch and not on the promoter (data not shown). The same reporter strategy was used to determine the activity of the other riboswitches associated with *xpt*, *21070*, and *27040* (Supplementary Fig. 4). The *xpt* riboswitch responded well to guanine and xanthine (>50% reduction in GusA activity), and to a lesser extent to guanosine. The riboswitch upstream of the transporter *21070* responded well to a high concentration of guanosine, with ~50% reduction in GusA at 3,000 mg/mL. For the other transporter *27040*, the reduction in GusA activity was observed mainly with xanthine, and little effect was observed with guanine and guanosine. These results suggest some level of specificity between the 4 guanine riboswitches in their natural context. It also suggests that depending on the intracellular levels of guanine and related metabolites, the activity of these riboswitches and the expression of their cognate genes will be modulated differently. In summary, our results confirm that the guanine riboswitches are functional in *C. difficile* and respond differently to guanine and related metabolites.



**Figure 13. Functionality of the *guaA* riboswitch determined by RT-qPCR and reporter assays.** A) RT-qPCR showing the expression of the *guaA* gene in *C. difficile* grown in MDM medium with increasing concentrations of guanine. B) GusA reporter assays with the *guaA* riboswitch. The activity was determined after 2 h of incubation in MDM broth supplemented with different concentrations of the indicated metabolites. The results shown in A and B represent the mean and standard deviations from 3 independent experiments. One-way analysis of variance (ANOVA) values compared to without ligand data: \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ .

## **Inactivation of *guaA* is associated with poor survival and infectivity in a mouse model of infection**

Our *in vitro* growth experiments suggest that under nutrient-limiting conditions, the activity of *guaA* becomes essential for bacterial survival. We therefore assessed the capacity of *guaA* mutants of *C. difficile* 630 to colonize mice and cause disease. For this, we used a co-infection strategy whereby equal numbers (*i.e.*  $10^5$ ) of *C. difficile* spores of the wild type and *guaA* mutant were co-administered simultaneously in a mouse model of infection. As shown in Fig. 14A, wild type cells readily colonized mice and reached high fecal titers ( $>10^8$  total CFU/g feces) as soon as 1 day post-infection, whereas the *guaA* mutant remained low with  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/g feces. After 2 days of infection, the mutant reached a maximum titer of  $\sim 10^6$  CFU/g feces, but was still 2-log below the wild type strain and at 6 days post-infection bacterial counts of the *guaA* mutant were below the limit of detection of  $10^3$  CFU/g feces. The total counts of the wild type strain started to decrease after 7 days, but were still over  $10^6$  CFU/g feces at day 9. When considering spores only, a similar trend was observed, although in this case the counts of the *guaA* mutant were very low 1 day post-infection and fell below the limit of detection at day 2 (Fig. 14B). Taken together, these results show that inactivation of *guaA* leads to severe colonization defects and poor infectivity and competitiveness in the mouse model of *C. difficile* infection. These results confirm the importance of *de novo* GMP biosynthesis during infection, and that targeting the riboswitch controlling *guaA* is a promising therapeutic strategy.



**Figure 14. Impact of *guaA* inactivation in the mouse model of *C. difficile* infection.** C57BL/6 mice were co-infected with  $10^5$  spores each of wild type strain 630 (empty dots) and *guaA* mutant (filled triangles). Total bacterial counts (A) and spore counts (B) are shown at different times post-infection and are reported as CFU/g feces. Each dot/triangle represents a single mouse. The limit of detection is  $10^3$  CFU/mL and is indicated by a dotted line.

## Discussion

In this study, we demonstrate the functionality of the guanine riboswitches in *C. difficile*, using RT-qPCR, in-line probing, and reporter gene assays. These riboswitches control the expression of *guaA*, *xpt*, *21070* and *27040*, 4 genes associated with GMP biosynthesis and transport of purine metabolites. These riboswitches bind guanine in the low nanomolar range, and we expect these riboswitches to participate actively in the fine regulation of the expression of the corresponding genes. We also provide experimental evidence showing the importance of *de novo* GMP biosynthesis in *C. difficile*. We demonstrate that inactivation of the *guaA* gene, encoding a GMP synthase, leads to severe growth defects under nutrient-limiting growth conditions, while growth is relatively unaffected under rich conditions. Our *in vivo* infection assays further demonstrate that inactivation of *guaA* causes a drastic reduction in competitiveness and colonization capacity of *C. difficile* in the mouse model.

Until now, the importance of *guaA* in *C. difficile* was predicted from experiments in which non-metabolizable guanine analogs inhibited growth of *C. difficile in vitro* (17). Similar observations were also made with *S. aureus*, and in the latter case, demonstration of the efficacy of guanine analogs in treating mastitis in mice and cows was made (17, 19). The overall conclusion was that guanine analogs were capable of blocking the expression of *guaA* through the associated riboswitch, thereby forcing bacteria to exhaust their GMP pool, leading to cell death (17). However, inactivation of *guaA* had never been done in *C. difficile* nor *S. aureus*, and our study thus provides the first direct experimental demonstration of the importance of *guaA* and GMP biosynthesis for growth of *C. difficile* under limiting conditions, as well as during infection. Previous studies have shown that inactivation of *guaA* encoding the GMP synthase results in reduced virulence of *Salmonella* in a mouse model of infection (27). Likewise, inactivation of *guaA* in *E. coli* is associated with guanine auxotrophy (28) and the inability of the bacterium to grow in urine *in vitro*, with a 2-3 log loss of viability after 6 h. In addition, a *guaA* mutant was significantly less virulent in a

mouse model of urinary tract infection (18). It thus appears that *de novo* biosynthesis of GMP is also crucial for full virulence of *C. difficile* in the gut.

One interesting aspect of guanine riboswitches in *C. difficile* is that the 4 of them are associated with only one gene predicted to participate to GMP biosynthesis and transport of purine precursors such as xanthine and hypoxanthine. In other clostridia such as *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium botulinum*, guanine riboswitches control an *xpt-pbuX* operon associated with xanthine metabolism and transport on the one hand, and a *guaB-guaA* operon associated with GMP biosynthesis from purine IMP and XMP on the other hand. This gene organization suggests co-regulation of transporters and enzymes associated with specific metabolic pathways by guanine-responsive riboswitches. In *B. subtilis*, 4 guanine riboswitches control either single genes (e.g. *pbuG* or *yxjA*) or transcriptional units associated with purine metabolism, like the *xpt-pbuX* and *pur* operons (9). In *Staphylococcus aureus* and other staphylococci, a simplified regulatory network for the control of GMP biosynthesis is observed, with a single guanine riboswitch controlling an operon comprising *xpt*, *pbuX*, *guaB* and *guaA* (17).

The inactivation mutants in *C. difficile* showed that only *guaA* seems essential under poor growth conditions. Inactivation of the xanthine phosphoribosyl transferase (Xpt) or the two transporters (21070 and 27040) did not impact growth of *C. difficile* *in vitro*. In these mutants, other alternative routes such as the purine salvation pathway are probably available to provide XMP to feed the GMP synthase (Fig. 9). We did not test double or triple mutants, so we cannot predict the consequence of the inactivation of one or the two transporters and *xpt* altogether, but the net result would possibly be similar to single mutants; salvation pathways would probably take the relay. The genome of *C. difficile* 630 also contains several other putative transporters of purine and related metabolites that are not associated with riboswitches, like *CD630\_20750* (*pbuX*, a putative xanthine permease), *CD630\_20900* and

*CD630\_20910* (two putative xanthine/uracile permeases), *CD630\_25940* (*uraA*, putative uracil permease), and *CD630\_31800* (putative purine permease). Although the functional characterization of these transporters is not available, we can expect that they participate in the transport of these metabolites. It is therefore not surprising that inactivation of *21070* and *27040* did not lead to growth defects *in vitro*.

The in-line probing data showed that the guanine riboswitches in *C. difficile* bind guanine and purine analogs in the low nanomolar range, which is consistent with values reported for other bacteria like *B. subtilis*, in which the guanine riboswitch controlling the *xpt-pbuX* operon has an apparent  $K_d$  value of  $\leq 5$  nM (9). Regions of the guanine aptamer, the so-called “Tune-Box”, can accommodate small differences in the unstructured and ligand-free form (29). Variations in the nucleotide composition of the tune-box can modify the affinity of a guanine riboswitch aptamer for its ligand. In fact, one of the hallmarks of riboswitches is their ability to discriminate between closely related metabolites, to avoid regulatory crosstalk between different metabolic pathways. For example, the TPP riboswitch from *E. coli* binds thiamine pyrophosphate (TPP) with a  $\sim 1,000$ -fold greater affinity than thiamine phosphate (TP) or thiamine (30). In *B. subtilis*, the  $K_d$  value of the *xpt-pbuX* guanine riboswitch aptamer towards xanthine and hypoxanthine is  $\sim 50$  nM, which is also 10 times higher than for guanine (9). We expected that the guanine riboswitches in *C. difficile* would have different affinities towards guanine and purine analogs due to the differences in their aptamer sequences. Although the differences in  $K_d$  values were small, we did observe some differences in the affinity toward guanine, xanthine and guanosine. In particular the riboswitches controlling the expression of the two enzymes GuaA and Xpt were sensitive to the presence of guanine, while the riboswitch controlling the transporter *27040* did not respond to guanine but was sensitive to xanthine mainly. The metabolism of purines and GMP is a complex multistep process involving multiple genes and transporters. We are still far from a clear picture of the system, but our study provides highly useful data on the importance of *de novo* GMP biosynthesis in *C. difficile*.

Targeting riboswitches with small molecules has potential in the search of new antibacterial drugs (6). Our study suggests that ligands specific for the *guaA* riboswitch should lead to repression of *guaA* expression and hence, should also lead to reduced virulence and competitiveness of *C. difficile* in the gut. Whether drugs targeting the 4 riboswitches at once would be better remains to be established, but the focus should certainly be put on the one controlling *guaA*, which is a crucial gene for GMP biosynthesis.

## Aknowledgements

This work was supported by a team grant from the Ministère du Développement Économique, de l'Innovation et de l'Exportation (MDEIE) to LCF and DL, from a discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to LCF, and from a Canadian Institutes for Health Research grant (CIHR) to DL. DL and LCF are members of the Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CRCHUS), DL and LCF hold a senior and a junior 2 salary awards from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS).

## References

1. Barbut F, Jones G, Eckert C (2011) Epidemiology and control of *Clostridium difficile* infections in healthcare settings: an update. *Curr Opin Infect Dis* 24:370–376.
2. Gerding DN, Lessa FC (2015) The Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection Inside and Outside Health Care Institutions. *Infect Dis Clin North Am*.



3. Jarrad AM, Karoli T, Blaskovich MAT, Lyras D, Cooper MA (2015) The *Clostridium difficile* drug pipeline: challenges in discovery and development of new agents. *J Med Chem*:150311114539004.
4. Keller JJ, Kuijper EJ (2015) Treatment of recurrent and severe *Clostridium difficile* infection. *Annu Rev Med* 66:373–386.
5. Rao K, Young VB (2015) Fecal Microbiota Transplantation for the Management of *Clostridium difficile* Infection. *Infect Dis Clin North Am* 29:109–122.
6. Lünse CE, Schüller A, Mayer G (2013) The promise of riboswitches as potential antibacterial drug targets. *Int J Med Microbiol*.
7. Blount KF, Breaker RR (2006) Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat Biotechnol* 24:1558–1564.
8. Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR (2003) Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA* 9:644–647.
9. Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* 113:577–586.
10. Mellin JR, Cossart P (2015) Unexpected versatility in bacterial riboswitches. *Trends Genet* 31:150–156.
11. Mulhbacher J, Lafontaine DA (2007) Ligand recognition determinants of guanine riboswitches. *Nucleic Acids Res* 35:5568–5580.
12. Kim JN, Breaker RR (2008) Purine sensing by riboswitches. *Biol Cell* 100:1–11.
13. Christiansen L, Schou S, Nygaard P, Saxild H (1997) Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the *xpt-pbuX* operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J Bacteriol* 179:2540.
14. Ebbole DJ, Zalkin H (1987) Cloning and characterization of a 12-gene cluster from *Bacillus subtilis* encoding nine enzymes for de novo purine nucleotide synthesis. *J Biol Chem* 262:8274–8287.
15. Xi H, Schneider BL, Reitzer L (2000) Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage. *J Bacteriol* 182:5332–5341.
16. Mäntsälä P, Zalkin H (1992) Cloning and sequence of *Bacillus subtilis* *purA* and *guaA*, involved in the conversion of IMP to AMP and GMP. *J Bacteriol* 174:1883–1890.

17. Mulhbach J *et al.* (2010) Novel riboswitch ligand analogs as selective inhibitors of guanine-related metabolic pathways. *PLoS Pathog* 6:e1000865.
18. Russo TA, Jodush ST, Brown JJ, Johnson JR (1996) Identification of two previously unrecognized genes (*guaA* and *argC*) important for uropathogenesis. *Mol Microbiol* 22:217–229.
19. Ster C *et al.* (2013) Experimental treatment of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *J Dairy Sci* 96:1000–1008.
20. Oyston PCF *et al.* (2010) A *Yersinia pestis* *guaBA* mutant is attenuated in virulence and provides protection against plague in a mouse model of infection. *Microb Pathog* 48:191–195.
21. Shimaoka M *et al.* (2006) Effects of *xapA* and *guaA* disruption on inosine accumulation in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:3069–3072.
22. Kotloff KL *et al.* (2004) Deletion in the *Shigella* enterotoxin genes further attenuates *Shigella flexneri* 2a bearing guanine auxotrophy in a phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208. *J INFECT DIS* 190:1745–1754.
23. Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Carter GP, Minton NP (2007) The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods* 70:452–464.
24. Karlsson S, Burman LG, Akerlund T (1999) Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by amino acids. *Microbiology (Reading, Engl)* 145 (Pt 7):1683–1693.
25. Regulski EE, Breaker RR (2008) In-line probing analysis of riboswitches. *Methods Mol Biol* 419:53–67.
26. Fagan RP, Fairweather NF (2011) *Clostridium difficile* has two parallel and essential Sec secretion systems. *Journal of Biological Chemistry* 286:27483–27493.
27. McFarland WC, Stocker BA (1987) Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of *Salmonella dublin* and of two strains of *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog* 3:129–141.
28. Effects of *xapA* and *guaA* Disruption on Inosine Accumulation in *Escherichia coli* (2014) Effects of *xapA* and *guaA* Disruption on Inosine Accumulation in *Escherichia coli*. 70:3069–3072. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=17151449&retmode=ref&cmd=prlinks>.

29. Stoddard CD *et al.* (2013) Nucleotides adjacent to the ligand-binding pocket are linked to activity tuning in the purine riboswitch. *J Mol Biol* 425:1596–1611.
30. Winkler W, Nahvi A, Breaker RR (2002) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419:952–956.
31. Sekulovic O, Fortier L-C (2014) Global transcriptional response of *Clostridium difficile* carrying the phiCD38-2 prophage. *Appl Environ Microbiol* 81:1364–1374.
32. Sekulovic O, Meessen-Pinard M, Fortier L-C (2011) Prophage-stimulated toxin production in *Clostridium difficile* NAP1/027 lysogens. *J Bacteriol* 193:2726–2734.
33. Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP (2009) A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *J Microbiol Methods* 78:79–85.
34. Mani N *et al.* (2002) Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression. *J Bacteriol* 184:5971–5978.
35. Garneau JR, Valiquette L, Fortier L-C (2014) Prevention of *Clostridium difficile* spore formation by sub-inhibitory concentrations of tigecycline and piperacillin/tazobactam. *BMC Infect Dis* 14:29.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### Supplementary TABLES

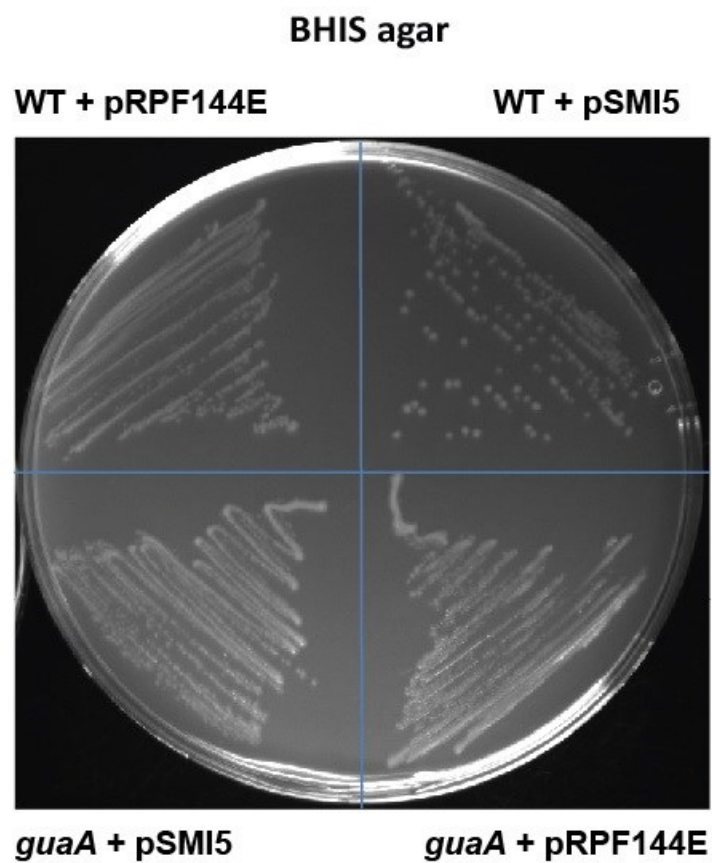
**Tableau 2 : Supplementary Table 1. Strains and plasmids used in this study**

Strain or plasmid	Description	Source
<i>Escherichia coli</i> CA434	Conjugation strain carrying the RP4 plasmid	(23)
<u><i>C. difficile</i></u>		
630 $\Delta$ erm (WT)		(23)
<i>guaA</i>	Strain 630 $\Delta$ erm carrying the group II intron in <i>guaA</i> (ClosTron Cdi- <i>guaA</i> -700s)	This study
<i>xpt</i>	Strain 630 $\Delta$ erm carrying the group II intron in <i>xpt</i> (ClosTron Cdi- <i>xpt</i> -285s)	This study
21070	Strain 630 $\Delta$ erm carrying the group II intron in 21070 (ClosTron Cdi-21070-1033s)	This study
27040	Strain 630 $\Delta$ erm carrying the group II intron in 27040 (ClosTron Cdi-27040-1019a)	This study
630-pSMI1	Strain 630 $\Delta$ erm carrying pSMI1	This study
630-pSMI2	Strain 630 $\Delta$ erm carrying pSMI2	This study
630-pSMI3	Strain 630 $\Delta$ erm carrying pSMI3	This study
630-pSMI4	Strain 630 $\Delta$ erm carrying pSMI4	This study
<i>guaA</i> -pSMI5	<i>guaA</i> strain complemented with pSMI5	This study
<i>guaA</i> -pRPF144 E	<i>guaA</i> strain complemented with pRPF144E	This study
<u>Plasmid</u>		
pRPF144	<i>gusA</i> reporter gene under constitutive cwp2 promoter	(26)
pLOS144	pRPF144 with a multiple cloning site inserted at the <i>SacI</i> site	This study
pSMI1	pLOS144 carrying the <i>guaA</i> riboswitch	This study
pSMI2	pLOS144 carrying the <i>xpt</i> riboswitch	This study
pSMI3	pLOS144 carrying the 27040 riboswitch	This study
pSMI4	pLOS144 carrying the 21070 riboswitch	This study
pSMI5	pRPF144 plasmid in which the <i>gusA</i> gene was replaced by <i>guaA</i>	This study

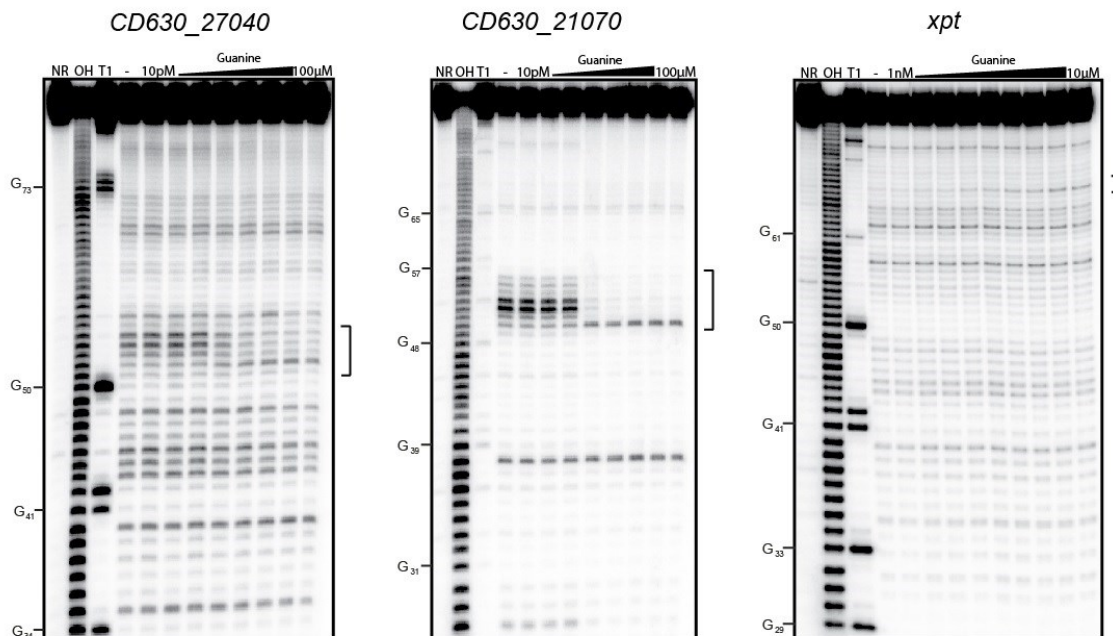
**Tableau 3 : Supplementary Table 2. Primers used in this study**

Name	Sense	Sequence (5'>3')	Target or purpose
LCF759	F	GGGACAAGATACTTACAAACTTCT	Flanking the ClosTron insertion site – to confirm inactivation of <i>guaA</i>
LCF760	R	ATTTCATGTCCACTTTCTATAACA	
LCF777	F	AGGAACTAGTACTGTTACAACATT	Flanking the ClosTron insertion site – to confirm inactivation of <i>27040</i>
LCF778	R	AACTGTAACAAAAGCAGGTACAGC	
LCF780	F	GAGCAGCTCTTCCATTTGCCAAAA	Flanking the ClosTron insertion site – to confirm inactivation of <i>xpt</i>
LCF781	R	CAGTGTTTCAGGAAATGATATACT	
LCF783	F	CTGTACCAAGCATTAAATATCCAAC	Flanking the ClosTron insertion site – to confirm inactivation of <i>21070</i>
LCF784	R	AGATTTAGGATATGTACTACATCC	
LCF841	F	GCTCGAGCTCACAAGGAGAGATGTGAATTTAT	To amplify <i>guaA</i> to create pSMI5 for complementation assays
LCF842	R	GGCCGGATCCAGAGAGACCTTAAATCCTGTA	
LCF843	F	GGCCCTCGAGAAATATAAACTCACTCGTAT	To amplify the <i>guaA</i> riboswitch to create pSMI1
LCF844	R	GCGCCTCGAGTTATATTACAAGTACTAATTCA	
LCF845	F	GGAACCTCGAGTTAGCCTTCTCTCAATATCTT	To amplify the <i>xpt</i> riboswitch to create pSMI2
LCF846	R	GCGACTCGAGAGGAATAAATTAATA	
LCF847	F	GGGCCTCGAGTTATTTCTGCATAGTACTAC	To amplify the <i>21070</i> riboswitch to create pSMI4
LCF848	R	GCGCCTCGAGTCGTAAAGAAAAATTCAT	
LCF849	F	GGCCCTCGAGCGATATAATACAACAGAA	To amplify the <i>27040</i> riboswitch to create pSMI3
LCF850	R	GCGCCTCGAGTTAACCTGGTTGTACATTGTT	
LCF837	F	NNNNGAGCTCCGAGCTCGGTACCCGGGGATCC	To amplify the MCS from pMTL84153 to create pLOS144
LCF838	R	NNNNGAGCTCCCAAGCTTGCATGTCTGCAGGCC	

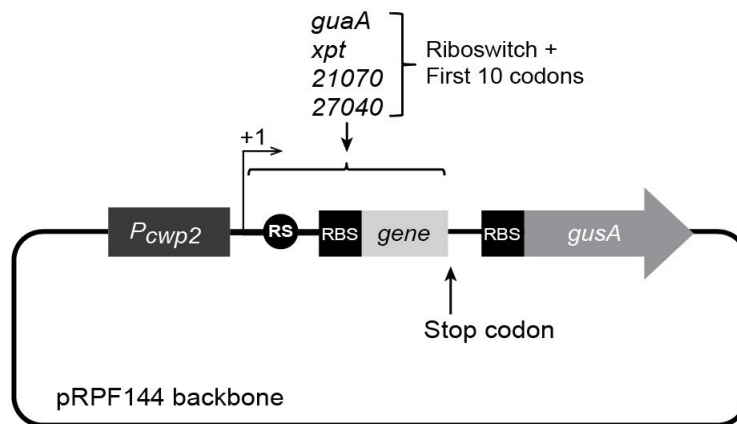
## Supplementary figures



**Figure 15 : Supplementary figure 1. Growth of WT and *guaA* mutant strains on BHIS agar.** The WT strain 630 and the *guaA* mutant strain were streaked on BHIS agar. The complemented *guaA* mutant (with pSMI5) was also included, along with an empty vector control (pRPF144E).

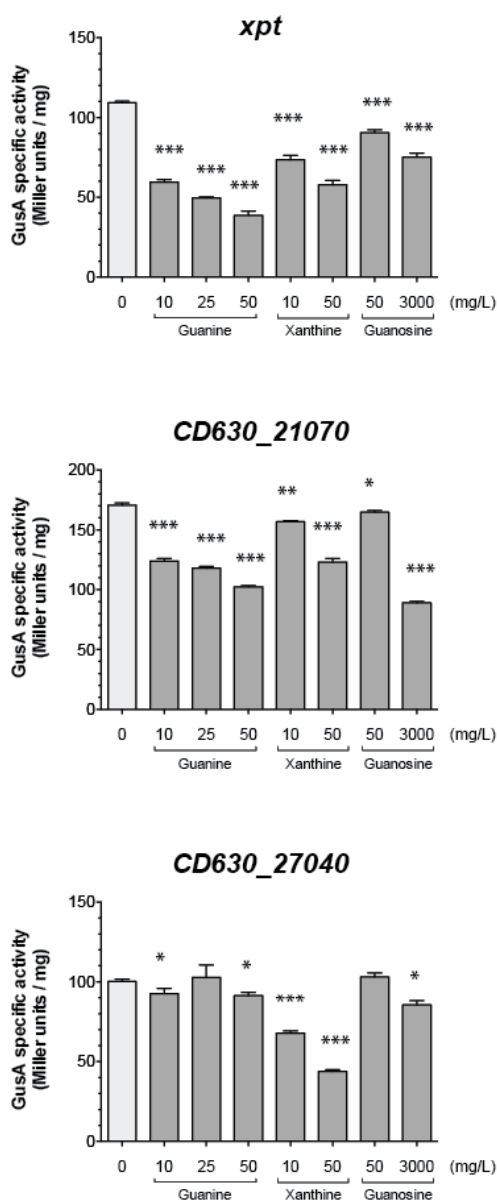


**Figure 16 : Supplementary figure 2. In-line probing assays.** In-line probing assays of the *C. difficile* *CD630\_2704*, *CD630\_21070*, and *xpt* riboswitches in the absence (-) or increasing concentrations (from 10 pM to 100 μM depending on the riboswitch) of guanine (G). Sites of substantial ligand-induced protections are indicated on the right by a vertical bracket. Lanes NR, L and T1 correspond to molecules that were not reacted or that were partially digested by alkali or by RNase T1, respectively. Guanines are identified on the left as molecular weight markers.



**Figure 17 : Supplementary figure 3. Schematic representation of the constructions used for the *GusA* reporter assays.** The plasmid backbone is the pRPF144 (26). The riboswitch aptamer + the first 10 codons of the corresponding gene was cloned downstream of the constitutive *P<sub>cwp2</sub>* promoter. A multiple cloning site was introduced upstream of the *gusA* gene in order to create a spacer between the stop codon from the inserted gene fragment and the ribosome binding site (RBS) from the *gusA* gene, thereby allowing maximal translation initiation efficiency.





**Figure 18 : Supplementary figure 4. Functionality of the *xpt*, *CD630\_21070*, and *CD630\_27040* riboswitches determined by reporter assays.** *GusA* reporter assays were conducted with pSMI2, pSMI3 and pSMI4, carrying transcriptional fusions of the *gusA* gene with the *xpt*, *27040*, and *21070* riboswitches, respectively. The activity was determined after 2 h of incubation in MDM broth supplemented with different concentrations of the indicated metabolites. The results shown are the mean and standard deviations from 3 independent experiments. One-way analysis of variance (ANOVA) values compared to without ligand data : \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ .

## CHAPITRE 3

### DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

#### 3.1. Rappel des objectifs du projet

Selon les CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), le pathogène *C. difficile* est maintenant considéré comme la menace la plus urgente à la santé humaine parmi les pathogènes bactériens. C'est en partie dû à sa capacité de résister aux antibiotiques dans sa forme sporulée, lui laissant la possibilité de coloniser le tractus intestinal après élimination du microbiote par prise d'antibiotiques à large spectre (Johnson et Gerding, 1998). Par ailleurs, on retrouve de plus en plus de souches émergentes de *C. difficile* démontrant des mécanismes de résistance contre des antibiotiques largement utilisés pour les traitements médicaux actuels (Peláez *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2007; Curry *et al.*, 2009; Spigaglia *et Mastrantonio*, 2004). Ces problématiques sont le résultat d'une utilisation abusive d'antibiotiques à large spectre lors du traitement d'infections. Une solution serait l'utilisation d'antibiotiques ciblés contre *C. difficile* afin de réduire l'impact du traitement sur la flore intestinale et de diminuer l'infection causée par le pathogène. C'est dans cette perspective que l'avancée des recherches dans le domaine des nouvelles cibles antibiotiques potentielles s'avère d'une importance grandissante. L'objectif de l'étude présentée faisait référence à la détermination et à la caractérisation d'une nouvelle cible potentielle démontrant un avenir prometteur, soit le riborégulateur, plus particulièrement le riborégulateur guanine et les gènes contrôlés par ce dernier chez *C. difficile* (Blount et Breaker, 2006).

Ce projet de recherche s'est concentré, en premier lieu, sur une approche d'analyse méthodique de la fonction et de l'efficacité de régulation du riborégulateur et, en deuxième lieu, sur la fonction et les conséquences de l'inhibition du produit du gène régulé. Cette approche s'est fondée sur des techniques de cartographie chimique (*In-line probing*), d'essai de gène rapporteur (*Bêta*-glucuronidase) et de RT-qPCR pour la partie sur la fonction et l'efficacité de régulation des riborégulateurs guanine de *C. difficile* 630, ainsi que sur des essais d'analyse de phénotype de croissance sur des mutants d'inactivation des quatre gènes sous contrôle de riborégulateurs guanine (*guaA*, *xpt*, 21070 et 27040) et des essais de comparaison d'infections chez un modèle animal (murin) d'un mutant d'inactivation du gène *guaA* de *C. difficile* 630.

### **3.2. Les riborégulateurs guanine chez *C. difficile* 630 détectent la guanine avec une haute affinité**

Les analyses à l'aide de la cartographie chimique présentées ici ont démontré qu'il y avait une liaison du ligand par l'aptamère. Le changement de structure des aptamères des quatre riborégulateurs guanine a été déterminé par des régions qui augmentaient en protection (moins de clivage) lorsqu'on rehaussait la concentration de guanine dans l'essai. Cette augmentation de protection ligand-dépendante est aussi un bon indice du ratio d'affinité des aptamères pour la guanine. Avec des ratios d'affinité ( $K_d$  ou constante de dissociation) dans le bas nanomolaire (nM), nous pouvons affirmer que les aptamères de *guaA*, *xpt*, 21070 et 27040 peuvent détecter leur ligand de manière très efficace. Bien que cet essai *in vitro* ne soit pas dans un contexte naturel, plusieurs publications dans la littérature scientifique font état d'un lien avec un résultat positif de liaison d'un métabolite par cartographie chimique et des essais *in-vivo* (Blount *et al.*, 2007; Mulhbachter *et al.*, 2010). En effet, les  $K_d$  retrouvées pour le riborégulateur *guaA* de  $2,61 \pm 1,29$  nM ainsi que les  $K_d$  pour les riborégulateurs *xpt*, 21070 et 27040 de  $1,78 \pm 0,95$ ,  $3,06 \pm 0,29$  and  $4,44 \pm 2,75$  nM respectivement sont

relativement les mêmes que celles retrouvées dans la littérature scientifique pour d'autres riborégulateurs guanine notamment chez *B. subtilis* (  $x_{pt}$  : 4,6 +/- 3,6 nM) (Mulhbachet et Lafontaine, 2007).

Il faut cependant tenir compte du fait que les concentrations libres et accessibles du ligand à l'intérieur de la cellule dans un contexte *in vivo* varient beaucoup de la concentration de ligand accessible à l'aptamère dans l'essai de cartographie chimique. De plus, puisque seul l'aptamère est utilisé dans l'essai, les concentrations nécessaires pour moduler l'expression de gènes pourraient être beaucoup plus élevées dans un contexte plus naturel. En effet, la seule partie de la plateforme d'expression utilisée dans les essais de cartographie chimique est la tige P1 qui est partagée entre la plateforme d'expression et l'aptamère (Regulski et Breaker, 2008). Sans prendre en compte la synergie nécessaire avec la polymérase d'ARN, le changement de conformation accompli par la structure de l'aptamère lié à la guanine demande beaucoup moins d'énergie pour transmettre le signal à la tige P1 seulement versus la tige P1 avec la plateforme d'expression complète. Hypothétiquement, ceci se reflètera dans les résultats *in vivo* où il faudra une plus haute concentration pour constater l'effet ligand.

Un fait intéressant est la différence entre les séquences des quatre riborégulateurs chez *C. difficile* 630. En effet, bien que les quatre aptamères aient des séquences avec des nucléotides conservés, il existe quelques différences entre les séquences. De plus, les plateformes d'expression sont elles aussi complètement différentes en composition de nucléotides et en séquence. Ces différences pourraient avoir un impact sur la reconnaissance du ligand ou le repliement de l'aptamère et de la plateforme d'expression. L'équipe du Dr Batey (2013) fait allusion à un «*tune-box*» situé dans la région correspondant aux nucléotides 21 à 25 des aptamères (Stoddard *et al.*, 2013) (Fig. 3). En mutant le «*tune-box*» de différents riborégulateurs guanine chez *B. subtilis*, le groupe de Batey a démontré un changement d'affinité dépendant des nucléotides qui composaient cette région. Dans cette région, les

riborégulateurs guanine de *C. difficile* 630 diffèrent tous entre eux. La différence des séquences des aptamères supportées par les trouvailles du Dr Batey (2013) pourrait révéler une différence dans l'affinité d'un riborégulateur pour un ligand, de sa spécificité et même de sa fonction au cœur d'un même organisme, et encore davantage, d'une même voie de biosynthèse. Cependant les quatre riborégulateurs guanine chez *C. difficile* 630 montrent une affinité similaire pour la guanine même si les séquences varient entre elles. Il est tout de même possible que les différences en affinité pour le ligand ne soient pas perceptibles au moyen de la technique utilisée (cartographie chimique). Ces différences pourraient aussi être indicatrices de variance dans les mécanismes de régulation des riborégulateurs guanine chez *C. difficile* 630 et pourraient avoir un impact sur l'efficacité de régulation, la spécificité du riborégulateur et même de l'affinité pour un ligand. Ces paramètres spécifiques pour chaque riborégulateur sont intéressants et importants pour la compréhension de l'implication de ces mécanismes de régulation chez *C. difficile*.

### **3.3. Contrôle de l'expression des gènes par les riborégulateurs guanine chez *C. difficile* 630**

*C. difficile* possède une notoriété répandue en tant que bactérie difficilement étudiable en laboratoire. Pour cette raison, les outils biotechnologiques utilisés et l'information sur la génétique de *C. difficile* sont moins accessibles. Bien qu'il soit possible de travailler avec les riborégulateurs de *C. difficile* dans un organisme qui faciliterait les manipulations biologiques, (il est possible de conjuguer un vecteur contenant un gène rapporteur *lacZ* contrôlé par un riborégulateur de *C. difficile* dans *E. coli* ou *B. subtilis*), les résultats sont plus représentatifs lorsqu'on fait les manipulations expérimentales chez l'espèce bactérienne étudiée.

Afin d'être plus rigoureux et de bien comprendre la mécanistique des riborégulateurs guanine chez *C. difficile* 630, toutes les manipulations et observations ont été faites directement dans *C. difficile* 630. Les résultats présentés ont été obtenus grâce à des outils biotechnologiques spécifiques aux *Clostridium*, tel le système d'inactivation de gène par insertion du Clostron (Heap *et al.*, 2007), des vecteurs de conjugaison avec un gène rapporteur de bêta-glucuronidase spécifique aux *Clostridium* (vecteurs pRPF144 et pRPF185) ainsi qu'une méthode mise au point d'extraction d'ARN au Trizol-chloroforme. Ces résultats reflètent le mieux possible ce qui se passe à l'intérieur de la cellule dans des conditions naturelles et démontrent de manière précise, la régulation attribuée au pouvoir de modulation de l'expression des gènes par les riborégulateurs guanine chez *C. difficile* 630. De plus, un alignement de séquence des quatre riborégulateurs guanine des souches de *C. difficile* 630, R20291, 196, M120 et M68 a été fait et une homologie de 100 % a été retrouvée à travers toutes les souches excluant M68 et la fin de la tige P1 de 27040 (voir annexe). Puisque les riborégulateurs guanine de *C. difficile* contrôlent les mêmes gènes chez chacune de ces souches, les résultats présentés ici pourraient s'appliquer aux autres souches de *C. difficile*.

### **3.3.1. La guanine baisse les niveaux d'activité enzymatique de la Bêta-glucuronidase sous contrôle d'un riborégulateur guanine *guaA* chez *C. difficile* 630**

Les constructions utilisées pour démontrer l'efficacité de régulation du riborégulateur *guaA* ont fait appel à un vecteur navette contenant un gène rapporteur codant pour la *bêta*-glucuronidase avec un insert correspondant au riborégulateur *guaA* situé en amont. Ces divers clones ont été incubés dans des milieux contenant des concentrations variées soit en guanine, en xanthine ou en guanosine. La réponse ligand-dépendante de l'activité enzymatique de la bêta-glucuronidase suggère une baisse de l'expression de l'ARNm du gène codant pour ce dernier par les riborégulateurs guanine. En effet, la guanine, ligand naturel du riborégulateur, baissait l'activité enzymatique de près de 50% par rapport au

milieu sans guanine à des concentrations de 50 mg/L guanine chez *C. difficile* 630. Cela concorde avec d'autres résultats observés pour des essais de gène rapporteur chez *B. subtilis* menés par le groupe Breaker (2003) et le groupe Lafontaine (2010) où une concentration de 0,5 mg/ml diminuait l'activité enzymatique de 50 % pour le riborégulateur *xpt* de *B. subtilis* (Mulhbach, *et al.* 2010; Mandal *et al.* 2003). Ces résultats concordent avec les données obtenues durant mes travaux de recherche et indiquent une régulation du gène sous contrôle du riborégulateur guanine *guaA* de façon ligand-dépendante (guanine-dépendante). Les différences en concentration nécessaires pour voir un effet ligand (diminuer l'expression ou l'activité enzymatique) s'expliquent par les diverses espèces bactériennes utilisées lors de l'étude (import membranaire) et des divers aspects techniques lors des manipulations.

Une baisse de l'activité enzymatique a également été observée avec une concentration en xanthine plus élevée. Cela s'explique du fait que la xanthine, un analogue de la guanine, n'a pas autant d'affinité pour le riborégulateur ( $K_d$  de  $24,1 \pm 2.3$  nM par cartographie chimique). D'après le groupe Breaker (Mandal *et al.* 2003) la xanthine démontre un  $K_d$  de 2 log supérieur à celle de la guanine (50 nM). Une baisse de l'activité ligand-dépendante pouvait être observée pour ce ligand. Cette baisse était moindre que celle observée lorsque la guanine était présente dans les mêmes concentrations corrélant avec l'affinité plus élevée du riborégulateur pour la guanine. Cela est également vrai pour les résultats présentés par le groupe Breaker lors des essais de gène rapporteur *lacZ* sur le riborégulateur guanine *xpt* de *B. subtilis* (Mandal *et al.* 2003). Par ailleurs, la guanosine exerçait aussi un contrôle sur l'activité de la bêta-glucuronidase. Le riborégulateur pourrait avoir une affinité pour ce sucre composé de guanine. Une hypothèse alternative serait le clivage de la partie sucre de la guanosine après import dans la cellule. La concentration de guanosine présente dans les milieux de culture lors des expériences serait suffisante pour augmenter la concentration intracellulaire de guanine, exerçant un contrôle sur l'expression de l'ARNm de la bêta-glucuronidase par l'intermédiaire du riborégulateur.

Chez *C. difficile*, il est probable que les divers riborégulateurs d'une même classe puissent posséder des affinités différentes pour leur ligand. Il est donc probable qu'un riborégulateur s'active à plus basse concentration, afin de bien maintenir l'homéostasie d'une voie métabolique ou afin de maintenir les concentrations d'un élément à un niveau précis. Cela a été discuté aussi chez *B. subtilis* qui démontrait une variance dans la concentration nécessaire afin d'atténuer l'expression de gène chez les divers riborégulateurs guanine, SAM-1, TPP et C-di-GMP (Mandal *et al.* 2003; Schyns *et al.* 2005). Le même résultat a été constaté chez *C. difficile* lors de nos essais. En effet, sur les quatre gènes régulés par les G-Box chez *C. difficile* 630 soit *guaA*, *xpt*, 21070 et 27040, deux interviennent directement dans le métabolisme de la voie de synthèse du GMP (*guaA*, *xpt*) et deux codent pour des transporteurs de précurseurs de cette même voie de synthèse (CD\_21070, CD\_27040) (Fig. 6). Les affinités pour les ligands naturels (guanine ou analogues), ou artificiellement conçus (PC1) (Mulhbachter *et al.*, 2010), retrouvés dans la littérature scientifique sur les riborégulateurs guanines sont reflétées ici dans les résultats pour les riborégulateurs guanine de *C. difficile* 630. De plus, les divergences au niveau des résultats d'expression d'ARNm ou d'activité enzymatique des gènes rapporteurs sont aussi similaires pour les résultats présentés dans ce mémoire sur les riborégulateurs guanine de *C. difficile* 630. Les résultats d'essais de gène rapporteur et de RT-qPCR démontraient des différences marquées pour chaque riborégulateur guanine (données non montrées). Ces subtilités suggèrent un univers complexe de régulation au sein de la même bactérie et d'autres études devront être menées afin d'obtenir un meilleur portrait global du patron de régulation exercé par les riborégulateurs guanine au sein d'une voie de biosynthèse des purines.



### **3.3.2. L'ajout de guanine dans les milieux de culture minimal de *C. difficile* 630 augmente les concentrations cellulaires de guanine et réduit les niveaux d'expression de l'ARNm des gènes contrôlés par les riborégulateurs guanine**

L'analyse quantitative et comparative de l'expression des ARNm de *C. difficile* en utilisant des milieux variant en concentration de guanine est une approche plus directe qu'un essai de gène rapporteur. En effet, ce n'est pas l'activité enzymatique d'une protéine codée par un plasmide dans *C. difficile* que l'on observe, mais bien l'ARNm du gène contrôlé par le riborégulateur directement. Ces analyses ont été faites à l'aide de la plateforme RNomique du Laboratoire de génomique fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke (LGFUS).

Le gène *guaA* fût le candidat le plus intéressant en lien avec les objectifs de cette étude. Les résultats obtenus suggèrent une baisse de l'expression de l'ARNm de *guaA* en présence de 300 mg/L de guanine dans le milieu minimal de culture en phase exponentielle. Il est important de comprendre qu'une concentration de guanine aussi élevée ne se retrouvera pas au même niveau intracellulaire. Cela s'explique par le caractère insoluble de la guanine. Sa solubilité la rend peu accessible pour l'importation. On peut donc imaginer que les concentrations accessibles au régulateur à l'intérieur de la cellule sont beaucoup plus faibles, même avec cette concentration. Les résultats obtenus en utilisant des concentrations de 50 et 100 mg/L de guanine et qui ne démontrent pas de baisse significative de l'expression des ARNm de *guaA* pourraient refléter ce phénomène. Des essais de RT-qPCR menés chez *B. subtilis* montrent une baisse d'expression de l'ARNm de 40 % en présence de 0,5 mg/ml guanine pour le riborégulateur *xpt* et une atténuation de l'expression de plus de 80 % pour le riborégulateur *pur* de *B. subtilis* avec la même concentration de guanine (Mandal *et al.* 2003). Ces résultats de RT-qPCR varient peu des résultats obtenus cités chez le groupe Breaker (2008) (0,3 mg/ml vs. 0,5 mg/ml). Ces observations reflètent les différences de régulation entre les riborégulateurs d'une même classe à l'intérieur de la même souche.

### **3.4. Importance des gènes régulés par les riborégulateurs guanine**

Le génome bactérien et la régulation des divers gènes au sein de la même bactérie sont complexes. Une multitude de gènes possédant diverses fonctions varient en importance chez la bactérie. Certains sont connus pour être des acteurs directs dans une voie métabolique (*lysC* chez *B. subtilis*, *guaA* chez *S. aureus* et *C. difficile*) d'autres sont des protéines membranaires de transport, d'autres encore servent à la motilité (*fliC* de *Vibrio cholerae*) ou peuvent être impliqués dans la virulence, la formation de biofilms, la sécrétion et l'attachement aux cellules épithéliales de l'hôte (Bordeleau *et al.*, 2015; Fuchs *et al.*, 2006; Furukawa *et al.*, 2012; Groisman *et al.*, 2013; Merino and Gutie, 2012; Takemoto *et al.*, 2014). Les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent une importance plus grande pour le gène *guaA* chez *C. difficile* 630, puisque ce dernier démontre une inhibition de croissance de la souche mutante *guaA* ainsi qu'une baisse du pouvoir infectieux de *C. difficile* lorsque le gène *guaA* est inactivé par insertion. Le gène *guaA* se révèle le candidat le plus prometteur pour la conception de molécules thérapeutiques mimant la guanine et ciblant plus particulièrement ce riborégulateur.

#### **3.4.1. Impact des mutants d'inactivation de gène par insertion sur la croissance bactérienne**

Les quatre gènes régulés par des riborégulateurs guanine ont été inactivés par insertion d'un intron de groupe II en utilisant le système Clostron (Heap *et al.*, 2007). Chaque mutant a ensuite subi des essais de croissance dans des milieux dits riches (TY, BHIS) et minimaux (Karlsson *et al.*, 1999), avec ou sans ajout du produit final de la voie de biosynthèse : le GMP. Le milieu pauvre a été choisi pour éviter les voies de contournement et forcer la bactérie à faire la synthèse de novo de GMP. Les résultats obtenus suggèrent une corrélation

directe avec la proximité du produit final dans la voie de biosynthèse du GMP et l'importance de ce gène pour la survie de *C. difficile* 630. En effet, le phénotype d'inhibition de croissance causé par l'inactivation par insertion a été observé seulement dans le cas du mutant *guaA*. Ce mutant possédait une GMP synthase inactivée. De plus le phénotype d'inhibition de croissance était seulement observable quand l'essai était mené dans un milieu minimal. Ces résultats ont démontré que non seulement *guaA* était important pour la croissance de *C. difficile* en comparaison avec d'autres gènes, mais ont aussi démontré qu'en abondance de nutriments (milieux BHIS et TY), *C. difficile* pouvait s'approvisionner en GMP à l'aide de voies de contournement de la GMP synthase. Cette hypothèse fût vérifiée lors des essais de croissance avec ajout de GMP dans le milieu. En effet, le phénotype d'inhibition de croissance retrouvé chez le mutant *guaA* a été perdu lors d'ajout de GMP, le produit du gène *guaA*. Le même résultat fût observé lorsque le mutant *guaA* fut complémenté du gène *guaA* sur le plasmide pSMI5. Ces résultats indiquent que le gène *guaA* de *C. difficile* 630 est essentiel pour sa croissance en milieu minimal et que cette inhibition est perdue lorsque la bactérie est en mesure de synthétiser le GMP ou qu'il soit en mesure de se l'approprier de manière extracellulaire. À l'appui des résultats indiquant l'importance de *guaA* pour la viabilité des cellules, il a été rapporté que l'atténuation de l'expression normale de *guaA* ou lorsque des mutations se produisent dans *guaA*, *Streptococcus suis* (Wilson *et al.*, 2007), *S. aureus* (Mulhbachter *et al.*, 2010; Ster *et al.*, 2013) et *Salmonella typhimurium* (McFarland et Stocker, 1987) ne réussissent pas à infecter de manière normale un modèle porcin, bovin et murin, respectivement. Ces résultats suggèrent que la biodisponibilité du GMP peut être réduite lors de l'infection de l'hôte et que *guaA* est susceptible d'être essentiel pour une infection bactérienne chez les mammifères. Ainsi, avec des études montrant l'importance de *guaA* pour la croissance bactérienne dans l'urine ou le sang (Russo *et al.*, 1996), nos données suggèrent que les sites d'infection chez les mammifères peuvent différer considérablement dans leurs compositions nutritives de ceux utilisés dans les analyses à grande échelle (Mulhbachter *et al.*, 2010) et que des précautions doivent être prises lors de l'évaluation de l'«essentialité» d'un gène.

### **3.4.2. Impact du mutant d'inactivation par insertion *guaA* sur le pouvoir infectieux de *C. difficile* 630**

À la lumière de l'importance du gène *guaA* pour la croissance de *C. difficile* 630 dans un milieu minimal, un essai d'infection par compétition dans un modèle murin a été mené. Cet essai avait pour but de vérifier si le phénotype d'inhibition de croissance se traduisait par une incapacité à infecter l'hôte, tel qu'observé chez *E. coli*, *S. suis*, *S. aureus* et *S. typhimurium* (Wilson *et al.* 2007; McFarland & Stocker 1987; Russo *et al.* 1996). Il avait aussi pour but de vérifier si *C. difficile* était en mesure de s'approvisionner en GMP dans l'intestin ou le colon lors d'une infection chez la souris. Les résultats issus de l'essai de compétition d'infection, de décompte de cellules végétatives et des décomptes de spores dans les fèces, démontrent une baisse importante dans le nombre de cellules et spores du mutant *guaA* versus le type sauvage. Cela concorde encore une fois avec ce qui a été trouvé dans la littérature scientifique sur le gène *guaA* et son importance dans d'autres espèces bactériennes pathogènes (McFarland et Stocker, 1987; Mulhbachter *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2007). De plus, les résultats reflètent ce qui a été observé lorsque l'expression du gène *guaA* a été réprimée par l'utilisation d'analogues de la guanine ciblant le riborégulateur guanine se trouvant en aval de *guaA* chez *S. aureus* (Mulhbachter *et al.*, 2010). Ces résultats, ainsi que les résultats d'inhibition de croissance, indiquent que le gène *guaA* est important, tant pour la croissance de *C. difficile* 630 dans un milieu minimal que lors d'infection dans un modèle murin. Il est donc proposé que les conditions environnementales chez les modèles d'infection animale puissent être moins élevées en concentration de nutriments importants que d'abord suggéré.

## Conclusion

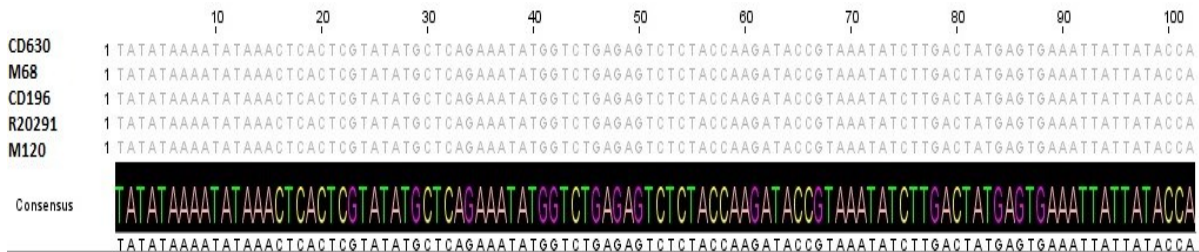
L'objectif principal du projet de maîtrise présenté dans ce mémoire était, de façon bien générale, d'accroître les connaissances sur les quatre riborégulateurs guanine de *C. difficile* et leurs effets sur la biologie de ce dernier. En effet, ce projet a été réalisé dans l'optique d'établir une relation sur la régulation effectuée par les riborégulateurs et l'importance des gènes régulés par ces derniers dans le cadre du développement d'agents thérapeutiques fondés sur des études menées sur d'autres espèces bactériennes. Aucune étude n'a été poursuivie auparavant sur les riborégulateurs guanine chez *C. difficile*. Les résultats obtenus et démontrés ici, suggèrent que le gène *guaA* qui intervient directement dans la biosynthèse du GMP, serait plus important pour la croissance que les trois autres gènes régulés par les riborégulateurs guanine. En effet, le mutant d'inactivation par insertion du gène *guaA* démontre une inhibition de croissance de deux logs par rapport au type sauvage dans un milieu minimal. Ce même mutant démontre aussi une baisse drastique de décompte cellulaire lors d'une co-infection avec le type sauvage dans un modèle murin. Ces résultats viennent supporter l'importance du gène *guaA* dans l'infection de l'hôte par *C. difficile*. De plus, le phénotype d'inhibition de croissance observé uniquement dans le milieu minimal suggère une importance accrue du gène *guaA* s'il y a une faible biodisponibilité du GMP au moment de l'infection. Cette hypothèse est aussi validée par les résultats d'infections, où le phénotype d'inhibition de croissance est conservé.

En parallèle, les essais de cartographies chimiques, de gène rapporteur et de RT-qPCR démontrent une réponse des quatre riborégulateurs guanine au ligand. Cela est autant vrai *In-vitro* qu'*In-vivo*. Aussi la spécificité des riborégulateurs pour la guanine étant élevée, il est tout de même possible pour le riborégulateur de lier des analogues de la guanine.

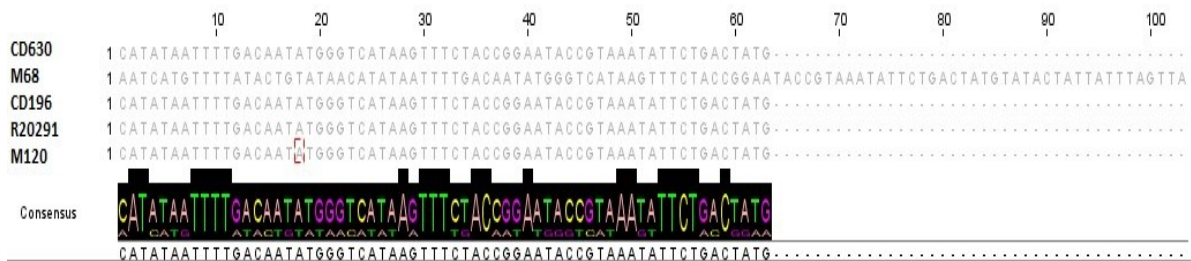
Un des objectifs secondaires de ce projet était d'établir une méthodologie permettant de choisir et définir le potentiel d'un riborégulateur chez *C. difficile* comme étant une bonne cible pour la conception de molécules pharmaceutiques. Les analyses faites durant ce projet ont réussi à démontrer l'importance du gène régulé sur la biologie de *C. difficile* et démontrent que le riborégulateur assure bien sa fonction de régulation. Ajouté aux résultats d'inhibition de croissance du mutant d'inactivation *guaA* lors d'une infection dans un modèle murin, ces résultats font ressortir le potentiel du riborégulateur guanine comme cible antibiotique.

Il reste beaucoup à étudier et à comprendre sur la biologie des riborégulateurs chez *C. difficile* 630, et les avenues possibles pour une application semblent prometteuses si on se fie aux résultats obtenus au cours du présent projet de recherche. Il y a encore beaucoup à découvrir sur les stratagèmes utilisés par les organismes unicellulaires pour la régulation de leur expression génique. Pour finir, chaque nouvelle percée scientifique sur *C. difficile* pave la voie à d'autres découvertes qui permettront de contrer les infections causées par ce pathogène opportuniste qui fait des victimes chaque jour dans le monde entier.

## ANNEXES



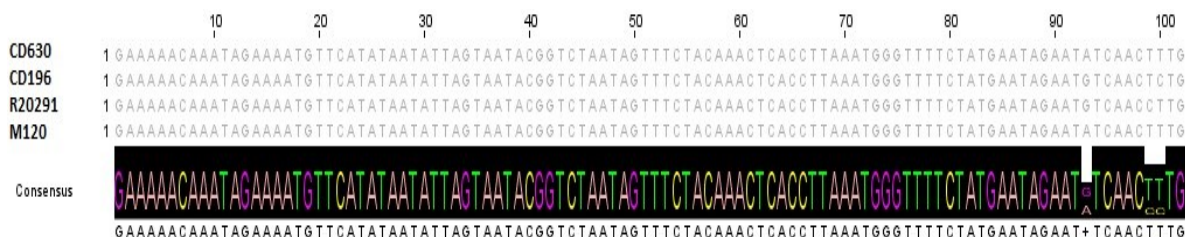
**Figure supplémentaire 1. Alignement de séquences du riborégulateur *guaA* de *C. difficile* 630, M68, 196, R20291 et M120.** Séquences correspondant aux riborégulateurs guanine *guaA* de cinq souches de *C. difficile*. Les séquences proviennent de NCBI. Les séquences commencent après le -10 (TATA box) et finissent au dernier nucléotide avant le codon «start» (ATG). La séquence consensus est surlignée en noir. La séquence correspond à la souche indiquée à sa gauche.



**Figure supplémentaire 2. Alignement de séquences du riborégulateur *xpt* de *C. difficile* 630, M68, 196, R20291 et M120.** Séquences correspondant aux riborégulateurs guanine *xpt* de cinq souches de *C. difficile*. Les séquences proviennent de NCBI. Les séquences commencent après le -10 (TATA box) et finissent au dernier nucléotide avant le codon «start» (ATG). La séquence consensus est surlignée en noir. La séquence correspond à la souche indiquée à sa gauche.



**Figure supplémentaire 3. Alignement de séquences du riborégulateur *CD\_21070* de *C. difficile* 630, M68, 196, R20291 et M120.** Séquences correspondant aux riborégulateurs guanine *CD\_21070* de cinq souches de *C. difficile*. Les séquences proviennent de NCBI. Les séquences commencent après le -10 (TATA box) et finissent au dernier nucléotide avant le codon «start» (ATG). La séquence consensus est surlignée en noir. La séquence correspond à la souche indiquée à sa gauche.



**Figure supplémentaire 4. Alignement de séquences du riborégulateur *CD\_27040* de *C. difficile* 630, M68, 196, R20291 et M120.** Séquences correspondant aux riborégulateurs guanine *CD\_27040* de cinq souches de *C. difficile*. Les séquences proviennent de NCBI. Les séquences commencent après le -10 (TATA box) et finissent au dernier nucléotide avant le codon «start» (ATG). La séquence consensus est surlignée en noir. La séquence correspond à la souche indiquée à sa gauche.



## BIBLIOGRAPHIE

- Aslam, S., Hamill, R.J., and Musher, D.M. (2005). Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet. Infect. Dis.* 5, 549–557.
- Badelt, S., Hammer, S., Flamm, C., and Hofacker, I.L. (2015). Thermodynamic and kinetic folding of riboswitches. *Methods Enzymol.* 553, 193–213.
- Baines, S.D., O'Connor, R., Saxton, K., Freeman, J., and Wilcox, M.H. (2009). Activity of vancomycin against epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 520–525.
- Baker, J.L., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Roth, A., Stockbridge, R.B., and Breaker, R.R. (2012). Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science* 335, 233–235.
- Barketi-Klai, A., Monot, M., Hoys, S., Lambert-Bordes, S., Kuehne, S.A., Minton, N., Collignon, A., Dupuy, B., and Kansau, I. (2014). The flagellin FliC of *Clostridium difficile* is responsible for pleiotropic gene regulation during in vivo infection. *PLoS One* 9, e96876.
- Barra-Carrasco, J., and Paredes-Sabja, D. (2014). *Clostridium difficile* spores: a major threat to the hospital environment. *Future Microbiol.* 9, 475–486.
- Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2007). The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol.* 8, R239.
- Bastet, L., Dubé, A., Massé, E., and Lafontaine, D.A. (2011). New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Mol. Microbiol.* 80, 1148–1154.
- Batey, R.T. (2012). Structure and mechanism of purine-binding riboswitches. *Q. Rev. Biophys.* 45, 345–381.
- Batey, R.T., Gilbert, S.D., and Montange, R.K. (2004). Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature* 432, 411–415.
- Biswas, P.P., Dey, S., Adhikari, L., and Sen, A. (2014). Virulence markers of vancomycin resistant enterococci isolated from infected and colonized patients. *J. Glob. Infect. Dis.* 6, 157–163.

- Blouin, S., Chinnappan, R., and Lafontaine, D. a. (2011). Folding of the lysine riboswitch: Importance of peripheral elements for transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 39, 3373–3387.
- Blount, K.F., and Breaker, R.R. (2006). Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat. Biotechnol.* 24, 1558–1564.
- Blount, K.F., Wang, J.X., Lim, J., Sudarsan, N., and Breaker, R.R. (2007). Antibacterial lysine analogs that target lysine riboswitches. *Nat. Chem. Biol.* 3, 44–49.
- Bocobza, S.E., and Aharoni, A. (2014). Small molecules that interact with RNA: riboswitch-based gene control and its involvement in metabolic regulation in plants and algae. *Plant J.* 79, 693–703.
- Bordeleau, E., Purcell, E.B., Lafontaine, D.A., Fortier, L.-C., Tamayo, R., and Burrus, V. (2015). Cyclic Di-GMP Riboswitch-Regulated Type IV Pili Contribute to Aggregation of *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 197, 819–832.
- Borriello, S.P. (1990). 12th C. L. Oakley lecture. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection of the gut. *J. Med. Microbiol.* 33, 207–215.
- Brazier, J.S., and Duerden, B.I. (1998). Guidelines for optimal surveillance of *Clostridium difficile* infection in hospitals. *Commun. Dis. Public Health* 1, 229–230.
- Buck, J., Wacker, A., Warkentin, E., Wöhnert, J., Wirmer-Bartoschek, J., and Schwalbe, H. (2011). Influence of ground-state structure and Mg<sup>2+</sup> binding on folding kinetics of the guanine-sensing riboswitch aptamer domain. *Nucleic Acids Res.* 39, 9768–9778.
- Burns, D.A., Heap, J.T., and Minton, N.P. (2010). The diverse sporulation characteristics of *Clostridium difficile* clinical isolates are not associated with type. *Anaerobe* 16, 618–622.
- Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A.D., and Fairweather, N.F. (2002). Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect. Immun.* 70, 5770–5778.
- Caron, M.-P., Bastet, L., Lussier, A., Simoneau-Roy, M., Massé, E., and Lafontaine, D.A. (2012). Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3444–E3453.
- Cech, T.R. (1988). Ribozymes and their medical implications. *JAMA* 260, 3030–3034.
- Chahine, E.B., Sucher, A.J., and Mantei, K. (2014). Fidaxomicin: a novel macrolide antibiotic for *Clostridium difficile* infection. *Consult. Pharm.* 29, 614–624.

Chander, P., Halbig, K.M., Miller, J.K., Fields, C.J., Bonner, H.K.S., Grabner, G.K., Switzer, R.L., and Smith, J.L. (2005). Structure of the Nucleotide Complex of *PyrR*, the *pyr* Attenuation Protein from *Bacillus caldolyticus*, Suggests Dual Regulation by Pyrimidine and Purine Nucleotides. *J. Bacteriol.* *187*, 1773–1782.

Cheah, M.T., Wachter, A., Sudarsan, N., and Breaker, R.R. (2007). Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* *447*, 497–500.

Chen, J., Liu, L., Wang, G., Chen, Y., Luo, Z., Huang, Y., Fu, Z., Yang, Y., and Liu, E. (2009). Correlation between usage of macrolide antibiotic and resistance of *Streptococcus pneumoniae* clinic isolates from Chongqing children's hospital. *Pediatr. Pulmonol.* *44*, 917–921.

Christiansen, L.C., Schou, S., Nygaard, P., and Saxild, H.H. (1997). Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the *xpt-pbuX* operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J. Bacteriol.* *179*, 2540–2550.

Clatworthy, A.E., Pierson, E., and Hung, D.T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 541–548.

Cohen, S.H., Gerding, D.N., Johnson, S., Kelly, C.P., Loo, V.G., McDonald, L.C., Pepin, J., and Wilcox, M.H. (2010). Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* *31*, 431–455.

Condon, C. (2007). Maturation and degradation of RNA in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 271–278.

Cormier, R., Burda, W.N., Harrington, L., Edlinger, J., Kodigepalli, K.M., Thomas, J., Kapolka, R., Roma, G., Anderson, B.E., Turos, E., et al. (2012). Studies on the antimicrobial properties of N-acylated ciprofloxacin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *22*, 6513–6520.

Cowardin, C.A., Kuehne, S.A., Buonomo, E.L., Marie, C.S., Minton, N.P., and Petri, W.A. (2015). Inflammasome activation contributes to interleukin-23 production in response to *Clostridium difficile*. *MBio* *6*.

Curry, S.R., Marsh, J.W., Shutt, K.A., Muto, C.A., O'Leary, M.M., Saul, M.I., Pasculle, A.W., and Harrison, L.H. (2009). High frequency of rifampin resistance identified in an epidemic *Clostridium difficile* clone from a large teaching hospital. *Clin. Infect. Dis.* *48*, 425–429.

- Dann, C.E., Wakeman, C.A., Sieling, C.L., Baker, S.C., Irnov, I., and Winkler, W.C. (2007). Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell* 130, 878–892.
- Diggle, M.A., and Clarke, S.C. (2005). Truncated *xpt* gene present in invasive *Streptococcus pneumoniae* may have implications for MLST schemes. *J. Med. Microbiol.* 54, 909–912.
- Dingle, T.C., Mulvey, G.L., and Armstrong, G.D. (2011). Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect. Immun.* 79, 4061–4067.
- Douris, A., Fedorka-Cray, P.J., and Jackson, C.R. (2008). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Agona slaughter isolates from the animal arm of the National Antimicrobial Resistance Monitoring System-Enteric Bacteria (NARMS): 1997 through 2003. *Microb. Drug Resist.* 14, 55–63.
- Drawz, S.M., and Bonomo, R.A. (2010). Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 160–201.
- Dupuy, B., Govind, R., Antunes, A., and Matamouros, S. (2008). *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J. Med. Microbiol.* 57, 685–689.
- Ellington, A.D., and Szostak, J.W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818–822.
- Emerson, J.E., Stabler, R.A., Wren, B.W., and Fairweather, N.F. (2008). Microarray analysis of the transcriptional responses of *Clostridium difficile* to environmental and antibiotic stress. *J. Med. Microbiol.* 57, 757–764.
- Fawley, W.N., Underwood, S., Freeman, J., Baines, S.D., Saxton, K., Stephenson, K., Owens, R.C., and Wilcox, M.H. (2007). Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 28, 920–925.
- Ferreira, J.A., Wu, K.J., Hryckowian, A.J., Bouley, D.M., Weimer, B.C., and Sonnenburg, J.L. (2014). Gut Microbiota-Produced Succinate Promotes *C. difficile* Infection after Antibiotic Treatment or Motility Disturbance. *Cell Host Microbe* 16, 770–777.
- Fox, I.H., and Kelley, W.N. (1972). Human phosphoribosylpyrophosphate synthetase. Kinetic mechanism and end product inhibition. *J. Biol. Chem.* 247, 2126–2131.
- Francis, M.B., Allen, C.A., Shrestha, R., and Sorg, J.A. (2013). Bile acid recognition by the *Clostridium difficile* germinant receptor, CspC, is important for establishing infection. *PLoS Pathog.* 9, e1003356.

Fuchs, R.T., Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (2006). The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 226–233.

Furukawa, K., Gu, H., Sudarsan, N., Hayakawa, Y., Hyodo, M., and Breaker, R.R. (2012). Identification of ligand analogues that control c-di-GMP riboswitches. *ACS Chem. Biol.* 7, 1436–1443.

Gallo, S., Oberhuber, M., Sigel, R.K.O., and Kräutler, B. (2008). The corrin moiety of coenzyme B12 is the determinant for switching the *btuB* riboswitch of *E. coli*. *Chembiochem* 9, 1408–1414.

Genth, H., Dreger, S.C., Huelsenbeck, J., and Just, I. (2008). *Clostridium difficile* toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 592–597.

Gerber, M., Walch, C., Löffler, B., Tischendorf, K., Reischl, U., and Ackermann, G. (2008). Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* 57, 776–783.

Gerding, D.N., Muto, C.A., and Owens, R.C. (2008). Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. *Clin. Infect. Dis.* 46 Suppl 1, S43–S49.

Ghim, S.Y., and Neuhard, J. (1994). The pyrimidine biosynthesis operon of the thermophile *Bacillus caldolyticus* includes genes for uracil phosphoribosyltransferase and uracil permease. *J. Bacteriol.* 176, 3698–3707.

Gilbert, S.D., Stoddard, C.D., Wise, S.J., and Batey, R.T. (2006a). Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain. *J. Mol. Biol.* 359, 754–768.

Gilbert, S.D., Mediatore, S.J., and Batey, R.T. (2006b). Modified pyrimidines specifically bind the purine riboswitch. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 14214–14215.

Gonçalves, C., Decré, D., Barbut, F., Burghoffer, B., and Petit, J.-C. (2004). Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1933–1939.

Gousia, P., Economou, V., Bozidis, P., and Papadopoulou, C. (2015). Vancomycin-Resistance Phenotypes, Vancomycin-Resistance Genes, and Resistance to Antibiotics of *Enterococci* Isolated from Food of Animal Origin. *Foodborne Pathog. Dis.*

Govind, R., and Dupuy, B. (2012). Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. *PLoS Pathog.* 8, e1002727.

Groisman, E.A., Hollands, K., Kriner, M.A., Lee, E.-J., Park, S.-Y., and Pontes, M.H. (2013). Bacterial Mg<sup>2+</sup> homeostasis, transport, and virulence. *Annu. Rev. Genet.* 47, 625–646.

Grundy, F.J., Rollins, S.M., and Henkin, T.M. (1994). Interaction between the acceptor end of tRNA and the T box stimulates antitermination in the *Bacillus subtilis* tyrS gene: a new role for the discriminator base. *J. Bacteriol.* 176, 4518–4526.

Gupta, A., Nelson, J.M., Barrett, T.J., Tauxe, R. V, Rossiter, S.P., Friedman, C.R., Joyce, K.W., Smith, K.E., Jones, T.F., Hawkins, M.A., et al. (2004). Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997–2001. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1102–1109.

Gusarov, I., and Nudler, E. (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol. Cell* 3, 495–504.

Gweon, T.G., Lee, K.J., Kang, D.H., Park, S.S., Kim, K.H., Seong, H.J., Ban, T.H., Moon, S.J., Kim, J.S., and Kim, S.W. (2015). A Case of Toxic Megacolon Caused by *Clostridium difficile* Infection and Treated with Fecal Microbiota Transplantation. *Gut Liver* 9, 247–250.

Haller, A., Rieder, U., Aigner, M., Blanchard, S.C., and Micura, R. (2011). Conformational capture of the SAM-II riboswitch. *Nat. Chem. Biol.* 7, 393–400.

Haller, A., Altman, R.B., Soulière, M.F., Blanchard, S.C., and Micura, R. (2013). Folding and ligand recognition of the TPP riboswitch aptamer at single-molecule resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4188–4193.

Halsey, J. (2008). Current and future treatment modalities for *Clostridium difficile*-associated disease. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 65, 705–715.

Hanessian, S., Giguère, A., Grzyb, J., Maianti, J.P., Saavedra, O.M., Aggen, J.B., Linsell, M.S., Goldblum, A.A., Hildebrandt, D.J., Kane, T.R., et al. (2011). Toward Overcoming *Staphylococcus aureus* Aminoglycoside Resistance Mechanisms with a Functionally Designed Neomycin Analogue. *ACS Med. Chem. Lett.* 2, 924–928.

Haran, J.P., Hayward, G., Skinner, S., Merritt, C., Hoaglin, D.C., Hibberd, P.L., Lu, S., and Boyer, E.W. (2014). Factors influencing the development of antibiotic associated diarrhea in ED patients discharged home: risk of administering IV antibiotics. *Am. J. Emerg. Med.* 32, 1195–1199.

He, D., Sougioultzis, S., Hagen, S., Liu, J., Keates, S., Keates, A.C., Pothoulakis, C., and Lamont, J.T. (2002). *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. *Gastroenterology* 122, 1048–1057.

- Heap, J.T., Pennington, O.J., Cartman, S.T., Carter, G.P., and Minton, N.P. (2007). The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J. Microbiol. Methods* 70, 452–464.
- Hennelly, S.P., Novikova, I. V, and Sanbonmatsu, K.Y. (2013). The expression platform and the aptamer: cooperativity between Mg<sup>2+</sup> and ligand in the SAM-I riboswitch. *Nucleic Acids Res.* 41, 1922–1935.
- Hoo, R., Lam, J.H., Huot, L., Pant, A., Li, R., Hot, D., and Alonso, S. (2014). Evidence for a Role of the Polysaccharide Capsule Transport Proteins in *Pertussis* Pathogenesis. *PLoS One* 9, e115243.
- Huang, I.-H., and Sarker, M.R. (2006). Complementation of a *Clostridium perfringens* spo0A mutant with wild-type spo0A from other *Clostridium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6388–6393.
- Huang, H., Wu, S., Wang, M., Zhang, Y., Fang, H., Palmgren, A.-C., Weintraub, A., and Nord, C.E. (2009a). *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 33, 339–342.
- Huang, W., Kim, J., Jha, S., and Aboul-ela, F. (2009b). A mechanism for S-adenosyl methionine assisted formation of a riboswitch conformation: a small molecule with a strong arm. *Nucleic Acids Res.* 37, 6528–6539.
- Jabes, D. (2011). The antibiotic R&D pipeline: an update. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 564–569.
- Jenkins, J.L., Krucinska, J., McCarty, R.M., Bandarian, V., and Wedekind, J.E. (2011). Comparison of a preQ1 riboswitch aptamer in metabolite-bound and free states with implications for gene regulation. *J. Biol. Chem.* 286, 24626–24637.
- Johnson, S., and Gerding, D.N. (1998). *Clostridium difficile*--associated diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 26, 1027–1034; quiz 1035–1036.
- Johnson, J.E., Reyes, F.E., Polaski, J.T., and Batey, R.T. (2012). B12 cofactors directly stabilize an mRNA regulatory switch. *Nature* 492, 133–137.
- Joyce, G.F. (1994). In vitro evolution of nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 331–336.
- Juang, P., and Hardesty, J.S. (2013). Role of fidaxomicin for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *J. Pharm. Pract.* 26, 491–497.

Kallen, A.J., Mu, Y., Bulens, S., Reingold, A., Petit, S., Gershman, K., Ray, S.M., Harrison, L.H., Lynfield, R., Dumyati, G., et al. (2010). Health care-associated invasive MRSA infections, 2005-2008. *JAMA* *304*, 641–648.

Karjalainen, T., Waligora-Dupriet, A.J., Cerquetti, M., Spigaglia, P., Maggioni, A., Mauri, P., and Mastrantonio, P. (2001). Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* *69*, 3442–3446.

Karlsson, S., Burman, L.G., and Akerlund, T. (1999). Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by amino acids. *Microbiology* *145* ( Pt 7), 1683–1693.

Kim, J.N., and Breaker, R.R. (2008). Purine sensing by riboswitches. *Biol. Cell* *100*, 1–11.

Kim, J.N., Blount, K.F., Puskarz, I., Lim, J., Link, K.H., and Breaker, R.R. (2009). Design and antimicrobial action of purine analogues that bind Guanine riboswitches. *ACS Chem. Biol.* *4*, 915–927.

Kortmann, J., Sczodrok, S., Rinnenthal, J., Schwalbe, H., and Narberhaus, F. (2011). Translation on demand by a simple RNA-based thermosensor. *Nucleic Acids Res.* *39*, 2855–2868.

Lee, E.R., Blount, K.F., and Breaker, R.R. (2009). NO ST Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression NO ST. *6*, 1–8.

Lemay, J.-F., Desnoyers, G., Blouin, S., Heppell, B., Bastet, L., St-Pierre, P., Massé, E., and Lafontaine, D.A. (2011). Comparative study between transcriptionally- and translationally-acting adenine riboswitches reveals key differences in riboswitch regulatory mechanisms. *PLoS Genet.* *7*, e1001278.

Lesho, E.P., Waterman, P.E., Chukwuma, U., McAuliffe, K., Neumann, C., Julius, M.D., Crouch, H., Chandrasekera, R., English, J.F., Clifford, R.J., et al. (2014). The antimicrobial resistance monitoring and research (ARMoR) program: the US Department of Defense response to escalating antimicrobial resistance. *Clin. Infect. Dis.* *59*, 390–397.

Lipfert, J., Skinner, G.M., Keegstra, J.M., Hensgens, T., Jager, T., Dulin, D., Köber, M., Yu, Z., Donkers, S.P., Chou, F.-C., et al. (2014). Double-stranded RNA under force and torque: Similarities to and striking differences from double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 15408–15413.

Lu, C., Smith, A.M., Fuchs, R.T., Ding, F., Rajashankar, K., Henkin, T.M., and Ke, A. (2008). Crystal structures of the SAM-III/S(MK) riboswitch reveal the SAM-dependent translation inhibition mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 1076–1083.



Lu, C., Smith, A.M., Ding, F., Chowdhury, A., Henkin, T.M., and Ke, A. (2011). Variable sequences outside the SAM-binding core critically influence the conformational dynamics of the SAM-III/SMK box riboswitch. *J. Mol. Biol.* 409, 786–799.

Ludwig W, Schleifer K-H, Whitman WB. Revised road map to the phylum Firmicutes. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, W.W. (2009). *The Firmicutes*. *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.* 2. Vol. 3., pp. 1–8.

Lünse, C.E., Schüller, A., and Mayer, G. (2014). The promise of riboswitches as potential antibacterial drug targets. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 79–92.

Mandal, M., and Breaker, R.R. (2004). Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 29–35.

Mandal, M., Boese, B., Barrick, J.E., Winkler, W.C., and Breaker, R.R. (2003). Riboswitches Control Fundamental Biochemical Pathways in *Bacillus subtilis* and Other Bacteria. *Cell* 113, 577–586.

Mandal, M., Lee, M., Barrick, J.E., Weinberg, Z., Emilsson, G.M., Ruzzo, W.L., and Breaker, R.R. (2004). A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* 306, 275–279.

Mansjö, M., and Johansson, J. The riboflavin analog roseoflavin targets an FMN-riboswitch and blocks *Listeria monocytogenes* growth, but also stimulates virulence gene-expression and infection. *RNA Biol.* 8, 674–680.

Mathur, H., Rea, M.C., Cotter, P.D., Paul Ross, R., and Hill, C. (2015). The potential for emerging therapeutic options for *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 5, 696–710.

Matzner, D., and Mayer, G. (2015). (Dis)similar Analogues of Riboswitch Metabolites as Antibacterial Lead Compounds. *J. Med. Chem.* 58, 3275–3286

McFarland, W.C., and Stocker, B.A. (1987). Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of *Salmonella dublin* and of two strains of *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* 3, 129–141.

McFarland, L. V, Elmer, G.W., and Surawicz, C.M. (2002). Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 1769–1775.

Merino, E., and Gutie, A. (2012). Elucidating metabolic pathways and digging for genes of unknown function in microbial communities : the riboswitch approach. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 18, 35–39

- Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* *15*, 8783–8798.
- Moghnieh, R., Estaitieh, N., Mugharbil, A., Jisr, T., Abdallah, D.I., Ziade, F., Sinno, L., and Ibrahim, A. (2015). Third generation cephalosporin resistant *Enterobacteriaceae* and multidrug resistant gram-negative bacteria causing bacteremia in febrile neutropenia adult cancer patients in Lebanon, broad spectrum antibiotics use as a major risk factor, and correlation w. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *5*, 11.
- Monaghan, T.M. (2015). New perspectives in *Clostridium difficile* disease pathogenesis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* *29*, 1–11.
- Montange, R.K., Mondragón, E., van Tyne, D., Garst, A.D., Ceres, P., and Batey, R.T. (2010). Discrimination between closely related cellular metabolites by the SAM-I riboswitch. *J. Mol. Biol.* *396*, 761–772.
- Mulhbacher, J., and Lafontaine, D.A. (2007). Ligand recognition determinants of guanine riboswitches. *Nucleic Acids Res.* *35*, 5568–5580.
- Mulhbacher, J., Brouillette, E., Allard, M., Fortier, L.-C., Malouin, F., and Lafontaine, D.A. (2010). Novel riboswitch ligand analogs as selective inhibitors of guanine-related metabolic pathways. *PLoS Pathog.* *6*, e1000865.
- Murray, R., Boyd, D., Levett, P.N., Mulvey, M.R., and Alfa, M.J. (2009). Truncation in the *tcdC* region of the *Clostridium difficile* PathLoc of clinical isolates does not predict increased biological activity of Toxin B or Toxin A. *BMC Infect. Dis.* *9*, 103.
- Nozinovic, S., Reining, A., Kim, Y.-B., Noeske, J., Schlepckow, K., Wöhnert, J., and Schwalbe, H. (2014). The importance of helix P1 stability for structural pre-organization and ligand binding affinity of the adenine riboswitch aptamer domain. *RNA Biol.* *11*, 655–656.
- Nygaard, P., and Saxild, H.H. (2005). The purine efflux pump PbuE in *Bacillus subtilis* modulates expression of the PurR and G-box (XptR) regulons by adjusting the purine base pool size. *J. Bacteriol.* *187*, 791–794.
- Pedrolli, D.B., Matern, A., Wang, J., Ester, M., Siedler, K., Breaker, R., and Mack, M. (2012). A highly specialized flavin mononucleotide riboswitch responds differently to similar ligands and confers roseoflavin resistance to *Streptomyces davawensis*. *Nucleic Acids Res.* *40*, 8662–8673.
- Penchovsky, R., and Stoilova, C.C. (2013b). Riboswitch-based antibacterial drug discovery using high-throughput screening methods. *Expert Opin. Drug Discov.* *8*, 65–82.

- Perdrizet, G.A., Artsimovitch, I., Furman, R., Sosnick, T.R., and Pan, T. (2012). Transcriptional pausing coordinates folding of the aptamer domain and the expression platform of a riboswitch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3323–3328.
- Phelan, R.M., DiPardo, B.J., and Townsend, C.A. (2012). A high-throughput screen for the engineered production of  $\beta$ -lactam antibiotics. *ACS Chem. Biol.* *7*, 835–840.
- Raffestin, S., Marvaud, J.C., Cerrato, R., Dupuy, B., and Popoff, M.R. (2004). Organization and regulation of the neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. *Anaerobe* *10*, 93–100.
- Regulski, E.E., and Breaker, R.R. (2008). In-line probing analysis of riboswitches. *Methods Mol. Biol.* *419*, 53–67.
- Regulski, E.E., Moy, R.H., Weinberg, Z., Barrick, J.E., Yao, Z., Ruzzo, W.L., and Breaker, R.R. (2008). A widespread riboswitch candidate that controls bacterial genes involved in molybdenum cofactor and tungsten cofactor metabolism. *Mol. Microbiol.* *68*, 918–932.
- Rodriguez-Palacios, A., Staempfli, H.R., Duffield, T., and Weese, J.S. (2007). *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* *13*, 485–487.
- Roth, A., and Breaker, R.R. (2009). The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 305–334.
- Russo, T.A., Jodush, S.T., Brown, J.J., and Johnson, J.R. (1996). Identification of two previously unrecognized genes (*guaA* and *argC*) important for uropathogenesis. *Mol. Microbiol.* *22*, 217–229.
- Samore, M.H., Venkataraman, L., DeGirolami, P.C., Merrigan, M.M., Johnson, S., Gerding, D.N., Carmeli, Y., and Harbarth, S. (2006). Genotypic and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* correlated with previous antibiotic exposure. *Microb. Drug Resist.* *12*, 23–28.
- Santner, T., Rieder, U., Kreutz, C., and Micura, R. (2012). Pseudoknot preorganization of the *preQ1* class I riboswitch. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 11928–11931.
- Schmidt, C., Löffler, B., and Ackermann, G. (2007). Antimicrobial phenotypes and molecular basis in clinical strains of *Clostridium difficile*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *59*, 1–5.
- Schultz, A.C., Nygaard, P., and Saxild, H.H. (2001). Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the *PucR* transcription activator. *J. Bacteriol.* *183*, 3293–3302.

Schyns, G., Potot, S., Geng, Y., Barbosa, T.M., Henriques, A., and Perkins, J.B. (2005). Isolation and characterization of new thiamine-deregulated mutants of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 187, 8127–8136.

Sclar, D.A., Robison, L.M., Oganov, A.M., Schmidt, J.M., Bowen, K.A., and Castillo, L. V (2012). Fidaxomicin for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: epidemiological method for estimation of warranted price. Clin. Drug Investig. 32, e17–e24.

Scott, L.J. (2013). Fidaxomicin: a review of its use in patients with *Clostridium difficile* infection. Drugs 73, 1733–1747.

See, I., Mu, Y., Cohen, J., Beldavs, Z.G., Winston, L.G., Dumyati, G., Holzbauer, S., Dunn, J., Farley, M.M., Lyons, C., et al. (2014). NAP1 strain type predicts outcomes from *Clostridium difficile* infection. Clin. Infect. Dis. 58, 1394–1400.

Serganov, A., and Nudler, E. (2013). A decade of riboswitches. Cell 152, 17–24.

Serganov, A., Yuan, Y.-R., Pikovskaya, O., Polonskaia, A., Malinina, L., Phan, A.T., Hobartner, C., Micura, R., Breaker, R.R., and Patel, D.J. (2004). Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. Chem. Biol. 11, 1729–1741.

Serganov, A., Huang, L., and Patel, D.J. (2008). Structural insights into amino acid binding and gene control by a lysine riboswitch. Nature 455, 1263–1267.

Sievert, D.M., Ricks, P., Edwards, J.R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., Kallen, A., Limbago, B., and Fridkin, S. (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 34, 1–14.

Silver, L.L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. Clin. Microbiol. Rev. 24, 71–109.

Sirard, S., Valiquette, L., and Fortier, L.-C. (2011). Lack of association between clinical outcome of *Clostridium difficile* infections, strain type, and virulence-associated phenotypes. J. Clin. Microbiol. 49, 4040–4046.

Soutourina, O.A., Monot, M., Boudry, P., Saujet, L., Pichon, C., Sismeiro, O., Semenova, E., Severinov, K., Le Bouguenec, C., Coppée, J.-Y., et al. (2013). Genome-wide identification of regulatory RNAs in the human pathogen *Clostridium difficile*. PLoS Genet. 9, e1003493.

Spigaglia, P., and Mastrantonio, P. (2004). Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. J. Med. Microbiol. 53, 1129–1136.

Ster, C., Allard, M., Boulanger, S., Lamontagne Boulet, M., Mulhbach, J., Lafontaine, D.A., Marsault, É., Lacasse, P., and Malouin, F. (2013). Experimental treatment of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *J. Dairy Sci.* 96, 1000–1008.

Stoddard, C.D., Montange, R.K., Hennelly, S.P., Rambo, R.P., Sanbonmatsu, K.Y., and Batey, R.T. (2010). Free state conformational sampling of the SAM-I riboswitch aptamer domain. *Structure* 18, 787–797.

Stoddard, C.D., Widmann, J., Trausch, J.J., Marcano-Velázquez, J.G., Knight, R., and Batey, R.T. (2013). Nucleotides Adjacent to the Ligand-Binding Pocket are Linked to Activity Tuning in the Purine Riboswitch. *J. Mol. Biol.* 425, 1596–1611.

Sudarsan, N., Wickiser, J.K., Nakamura, S., Ebert, M.S., and Breaker, R.R. (2003). An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes Dev.* 17, 2688–2697.

Sudarsan, N., Hammond, M.C., Block, K.F., Welz, R., Barrick, J.E., Roth, A., and Breaker, R.R. (2006). Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions. *Science* 314, 300–304.

Sun, X., and Hirota, S.A. (2015). The roles of host and pathogen factors and the innate immune response in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Mol. Immunol.* 63, 193–202.

Surawicz, C.M. (2015). *Clostridium Difficile* Infection: Risk Factors, Diagnosis and Management. *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* Current treatment options in gastroenterology. 13, 121-119

Takemoto, N., Tanaka, Y., and Inui, M. (2014). The physiological role of riboflavin transporter and involvement of FMN-riboswitch in its gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology.* 98, 4159-4168

Tasteyre, A., Barc, M.C., Collignon, A., Boureau, H., and Karjalainen, T. (2001). Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect. Immun.* 69, 7937–7940.

Tauxe, R. V, Puhr, N.D., Wells, J.G., Hargrett-Bean, N., and Blake, P.A. (1990). Antimicrobial resistance of Shigella isolates in the USA: the importance of international travelers. *J. Infect. Dis.* 162, 1107–1111.

Taylor, P., Jain, S.S., Sonavane, U.B., Uppuladinne, M.V.N., Emily, C., Wang, W., Black, S., and Joshi, R.R. (2013). Structural insights into the interactions of *xpt* riboswitch with

novel guanine analogues : a molecular dynamics simulation study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–10.

Thirumalai, D., Lee, N., Woodson, S.A., and Klimov, D. (2001). Early events in RNA folding. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 52, 751–762.

Thore, S., Leibundgut, M., and Ban, N. (2006). Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. *Science* 312, 1208–1211.

Tinoco, I., and Bustamante, C. (1999). How RNA folds. *J. Mol. Biol.* 293, 271–281.

Unger, M., Eichhoff, A.M., Schumacher, L., Stryio, M., Menzel, S., Schwan, C., Alzogaray, V., Zylberman, V., Seman, M., Brandner, J., et al. (2015). Selection of Nanobodies that Block the Enzymatic and Cytotoxic Activities of the Binary *Clostridium Difficile* Toxin CDT. *Sci. Rep.* 5, 7850.

Vicens, Q., Mondragón, E., and Batey, R.T. (2011). Molecular sensing by the aptamer domain of the FMN riboswitch: a general model for ligand binding by conformational selection. *Nucleic Acids Res.* 39, 8586–8598.

De Vos, A.F., Dessing, M.C., Lammers, A.J.J., de Porto, A.P.N.A., Florquin, S., de Boer, O.J., de Beer, R., Terpstra, S., Bootsma, H.J., Hermans, P.W., et al. (2015). The Polysaccharide Capsule of *Streptococcus pneumonia* Partially Impedes MyD88-Mediated Immunity during Pneumonia in Mice. *PLoS One* 10, e0118181.

Voth, D.E., and Ballard, J.D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 247–263.

Wachter, A., Tunc-Ozdemir, M., Grove, B.C., Green, P.J., Shintani, D.K., and Breaker, R.R. (2007). Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *Plant Cell* 19, 3437–3450.

Waligora, A.J., Hennequin, C., Mullany, P., Bourlioux, P., Collignon, A., and Karjalainen, T. (2001). Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect. Immun.* 69, 2144–2153.

West, T.P. (2004). Control of pyrimidine biosynthesis in “*Pseudomonas alkanolytica*” ATCC 21034. *J. Basic Microbiol.* 44, 253–257.

Wilcox, M.H., and Fawley, W.N. (2000). Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*. *Lancet* 356, 1324.

- Wilson, T.L., Jeffers, J., Rapp-Gabrielson, V.J., Martin, S., Klein, L.K., Lowery, D.E., and Fuller, T.E. (2007). A novel signature-tagged mutagenesis system for *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet. Microbiol.* 122, 135–145.
- Winkler, W.C. (2005). Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 594–602.
- Winkler, W., Nahvi, A., and Breaker, R.R. (2002a). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419, 952–956.
- Winkler, W.C., Cohen-Chalamish, S., and Breaker, R.R. (2002b). An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15908–15913.
- Winkler, W.C., Nahvi, A., Sudarsan, N., Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2003). An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat. Struct. Biol.* 10, 701–707.
- Worthington, R.J., and Melander, C. (2013). Overcoming resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Org. Chem.* 78, 4207–4213.
- Xue, X., Yongjun, W., and Zhihong, L. (2015). Folding of SAM-II riboswitch explored by replica-exchange molecular dynamics simulation. *J. Theor. Biol.* 365, 265–269.
- Yarnell, W.S., and Roberts, J.W. (1999). Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. *Science* 284, 611–615.
- Yutin, N., and Galperin, M.Y. (2013). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ. Microbiol.* 15, 2631–2641.

